

**Physiologisch - chemische und histo-chemische
Phosphatasestudien**

Gerhard Wilhelm

1957

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Universität München
Vorstand: Professor Dr. A. Marchionini

Physiologisch - chemische und histo-chemische
Phosphatasestudien

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
verfaßt und einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Gerhard W i l h e l m
aus
Augsburg
1957

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Privatdozent Dr. S p i e r

Dekan : Professor Dr. W. B i c k e n b a c h

Tag der mündlichen Prüfung:28.6.52..

I n h a l t s ü b e r s i c h t :

I. E i n l e i t u n g : Nomenklatur, Einteilung und Eigenschaften der Phosphatasen

II. E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n :

A Darstellung und Reinigung der Monophosphoesterasen

- 1.) Alkalische Phosphatase
- 2.) Saure Phosphatase

B Zur biochemischen Aktivitätsbestimmung der alkalischen bzw. sauren Phosphomonoesterasen

C Zur Frage der histo-chemischen Nachweisbarkeit spezifischer Hemmstoffe für saure bzw. alkalische Phosphomonoesterasen in tuberkulösem Hautgewebe (Lupus vulgaris)

- 1.) Darstellung und Reinigung der DNS aus Kalbsthymus
- 2.) Zur histo-chemischen Nachweisbarkeit der Desoxyribonukleinsäure (DNS) im verkästen tuberkulösen Gewebe mittels Feulgen-Färbung
- 3.) DNS als Hemmer der sauren Phosphatase (Versuche in vitro)
- 4.) Histo-chemische Versuche, phosphatasehemmende Strukturen im tuberkulösen Gewebe nachzuweisen
- 5.) Zur Hemmbarkeit der sauren Phosphomonoesterase durch Beryllium-Ionen

D Über die saure Phosphatase des Stratum corneum

- 1.) in normalen Hautschuppen
- 2.) in Psoriasis-Schuppen
- 3.) in Ekzem-Hautschuppen

E Zur Nachweisbarkeit einer Nukleinasen (DNS-Depolymerase) im Normalschuppeneluat, Psoriasis-schuppeneluat und im Prostataphosphatasepräparat

III. Z u s a m m e n f a s s u n g

IV. B i b l i o g r a p h i e

V. L e b e n s l a u f



I. E i n l e i t u n g : Nomenklatur, Einteilung und Eigenschaften der Phosphatasen

Unter Phosphatasen versteht man Fermente, die imstande sind Phosphorsäureester hydrolytisch zu spalten. Man unterscheidet zwischen Ortho-, Pyro- und Triphosphatasen, je nachdem das Enzym Ortho-, Pyro- oder Triphosphorsäureester zu hydrolysieren vermag. In der Nomenklatur soll weiter zum Ausdruck gebracht werden, ob sich die spezifische Fermentwirksamkeit auf Phosphorsäuremono- oder -diester erstreckt. Man spricht demzufolge von Phosphorsäuremono- bzw. -diesterasen.

Di- und Monoesterasen lassen sich weiter nach ihrem pH-Optimum einteilen. Ist das Enzym vor allem im sauren (alkalischen) Milieu wirksam, so spricht man von saurer (alkalischer) Phosphatase. Eine weitere Unterteilung wird dadurch getroffen, daß man von stark- bzw. schwachsauren (stark- bzw. schwachalkalischen) Phosphatasen spricht, je nach der Lage ihres Wirkungsoptimums im pH-Bereich von 3-4 bzw. 5-6 (8-9 bzw. 9-10).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich vor allem mit der sauren und alkalischen Phosphorsäuremonoesterase, also mit Fermenten, welche Phos-

phorsäureester von der allgemeinen Formel $R-O-P \begin{matrix} /OH \\ =O \\ \backslash OH \end{matrix}$ unter Aufnahme von H_2O in ihre Säure (H_3PO_4) und ihre org. Alkoholkomponente ($R-OH$) spalten.

Die Phosphatasen, d.h. die Holofermente, setzen sich aus zwei Molekülanteilen zusammen: dem C o f e r m e n t und A p o f e r m e n t . Ersteres, das nach A L B E R S, B E Y E R, B O H - N E N K A M P und M Ü L L E R (2) bei allen Phosphatasen ähnlich gebaut sein soll, ist als niedermolekularer, dialysabler Körper innerhalb gewisser Grenzen thermostabil. Es bestimmt die W i r - k u n g s s p e z i f i t ä t . Die Fähigkeit des Enzyms,

Phosphorsäureester zu hydrolysieren, wird demnach den besonderen Eigenschaften der Cophosphatase zugeschrieben. Dagegen ist das A p o f e r m e n t als Eiweißkörper thermolabil und gegenüber organischen Solventien und Eiweißfällungsmitteln sehr empfindlich. Es bestimmt vor allem die S u b s t r a t s p e z i f i t ä t und die Lage des Aktivitätsoptimums. Die Dissoziation des Holoferments in das Co- und Apoferment und damit auch die Wirksamkeit, ist, wie eine chem. Reaktion, weitgehend von der H-Ionenkonzentration (2) abhängig. Demnach sind die Holofermentmoleküle der sauren (alkalischen) Phosphatase bei mäßig saurer (alk.) Reaktion nur geringgradig dissoziiert. Nach A L B E R S soll die Cophosphatase ständig zwischen den Apofermenten der sauren und alkalischen Phosphatase hin- und herwandern. Man kann deshalb mit einer gewissen Berechtigung die saure und alkalische Phosphatase als C o - p h o s p h a t a s e r e s e r v e der Zelle bezeichnen.

Nicht nur die H-Ionenkonzentration kann die Phosphataseaktivität hemmend oder aktivierend beeinflussen, sondern auch organische und anorganische Begleitstoffe. Zu den bekanntesten H e m m s t o f f e n für die saure Phosphatase zählt man Fluorid-Ionen. Bei der Fluoridwirkung soll es sich um eine streng kompetitive Hemmung (17) handeln und durch Dialyse teilweise reversibel sein. Demnach führt eine Erhöhung der Substratkonzentration zu einer Herabsetzung der Fluoridhemmung und umgekehrt. Einen starken Hemmeffekt üben auch M o l y b d a t e auf die saure Phosphatase aus. Er ist ebenfalls kompetitiv (4), aber vollständig reversibel (26). P h o s p h a t e und A r s e n a t e unterscheiden sich von den erwähnten Hemmkörpern dadurch, daß sie auch auf die alkalische Phosphatase hemmend einwirken.

Chemische Substanzen mit aktivierenden Eigenschaften erhöhen die Enzymaktivität indirekt dadurch, daß sie einen Antihemmstoffeffekt besitzen oder die Enzym-Substratverbindung zu stabilisieren vermögen. Andere Stoffe wieder können direkt aktivierend auf das Ferment einwirken. Als Antihemmstoffe für die alkalische Phos-

phatase seien Mg-Ionen und für die saure Phosphatase noch Zitronensäure kurz erwähnt. Weitere Einzelheiten über Aktivierbarkeit und Hemmbarkeit saurer Phosphatasen siehe R O S E N M U N D (24). Im übrigen wird in den entsprechenden Abschnitten dieser Arbeit auf weitere Einzelheiten eingegangen werden.

II. Eigene Untersuchungen:

A Darstellung und Reinigung der Monophospho- esterasen

Für die Darstellung der Organmonophosphoesterasen im enzymatisch einheitlichen Zustand ist die Wahl des richtigen Organs als Ausgangsmaterial von wesentlicher Bedeutung. Es gibt Organe, die sehr reich an dem einen und sehr arm an dem anderen Ferment sind. So eignet sich für die Gewinnung der s a u r e n P h o s p h a t a s e besonders Schweineleber, Ejakulat des Mannes und die Prostata (3), für die Darstellung der a l k a l i s c h e n P h o s p h o e s t e r a s e Schweineniere und Rinderleber.

Man geht deshalb von einem Organ mit hohem Fermentgehalt aus, weil man bei der Darstellung eines hochaktiven Präparates auf viele Reinigungsprozesse verzichten kann, denen zwei grundsätzliche Nachteile anhaften. Erstens geht bei jedem Anreicherungsverfahren immer ein Teil des Enzyms mit den Rückständen verloren. Zweitens sind die gereinigten Präparate in Lösung unbeständiger als die Rohpräparate; ihre Aktivität nimmt mit der Zeit etwas ab (16).

Alkalische Phosphatase

Zur Präparation und Reinigung der alkalischen Monophosphoesterase wurden nach A B U L F A D L und E. J. K I N G (1) frische, gesunde S c h w e i - n e n i e r e n enthäutet, vom Fett befreit, gut gewaschen und mit dem Fleischwolf zerkleinert. Der Organbrei (1700 g) wird mit dem gleichen Gewicht einer Mischung von: Azeton 250,0, Toluol 50,0, Äthylazetat 50,0, Aqua dest ad 1000, versetzt. Das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur 4 Tage unter gelegentlichem Umschütteln der Autolyse unterworfen, durch Musselin und danach durch ein Faltenfilter filtriert. 1400 ccm des klaren, gelben Filtrats in der Kälte bis zu einer Konzentration von 55 % (Gew.) mit Azeton pur. behandelt, ergab einen Niederschlag.

Dieser wurde durch Dekantieren und Zentrifugieren von der Flüssigkeit getrennt, zweimal mit Azeton gewaschen und im Vakuum getrocknet.
Ergebnis: 12,1 g pulverisierte Substanz.

Von 6 g der Substanz wurde eine 1,5%ige, wässrige (Aqua dest.) Lösung hergestellt, die durch Zentrifugieren geklärt, mit Azeton (38%) einen Niederschlag ergab. Abtrennung durch abermaliges Zentrifugieren. Durch Zugabe von reinem Azeton (bis 50%iger Sättigung) erhielt man als Fällung eine Proteinfraction von beträchtlicher Phosphataseaktivität. Der Niederschlag, abzentrifugiert und im Vakuum getrocknet, wog 418 mg. Das Präparat wurde im getrockneten Zustand als Pulver aufbewahrt und die jeweilige Lösung immer frisch zubereitet (vgl. Aktivitätsbestimmung).

Saure Phosphatase

Eine Darstellung der im sauren Milieu wirksamen Phosphomonoesterasen ist auf dem vorher erwähnten Wege nicht möglich, da die saure Phosphatase gegenüber Alkohol, Äther und Azeton als Fällungsmittel sehr empfindlich ist. Außerdem können Elektrolyte (z.B. NaCl) in Gegenwart von Puffern inaktivierend wirken.

Bei der Gewinnung der sauren Phosphatase aus Prostata Drüsen - es handelt sich praktisch um das 5,5-Enzym - geht man von vornherein von einem Organ mit einem hohen Gehalt an saurer Phosphatase aus. Mit einigen Ausnahmen hielten wir uns an die Reinigungsvorschrift von W. KUTSCHER u.a. (15,16). Die Drüsen stammten von Prostatektomierten⁺. Das Gewebe besteht also aus den eigentlichen atrophischen Pro-

⁺Herrn Prof. Dr. F. May, Chefarzt der Urolog. Abtlg. des Städt. Krankenhauses München, Thalkirchner Straße, sei für Überlassung des Materials herzlich gedankt.

stata- und den gewucherten Paraurethraldrüsen. Die Organe wurden im Laufe von acht Wochen gesammelt und in der Tiefkühltruhe bei -18°C aufbewahrt.

Nach dem Auftauen wurde das Material so gut als möglich von der bindegewebigen Kapsel befreit und im Fleischwolf zerkleinert. 175 g Organbrei wurden mit der 4-fachen Menge an destilliertem Wasser und 20 ccm Toluol als Schutzschicht verrührt, 5 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen, das Autolysat abzentrifugiert und die Gewebsreste gut abgepreßt. Bei der 4-tägigen Dialyse der trüben, eiweißreichen Fermentlösung im Kollodiumschlauch gegen Aqua dest. trat eine weißliche Fällung auf, die sich bei der geringsten Erschütterung wieder löste und durch jedes Papierfilter hindurchging. - Eine Reinigung der Fermentlösung durch Abfiltrieren des Niederschlages, wie es K U T S C H E R und W Ö R N E R bei der Elektrodialyse erzielt hatten, war also hier nicht möglich.

Wie schon erwähnt, ist die Prostataphosphatase äußerst empfindlich gegenüber Äther, Alkohol und Azeton als Fällungsmittel. Die fraktionierte Fällung erfolgte deshalb mit Ammoniumsulfat, indem zu der Enzymlösung (525 ccm) zunächst $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in fester Form bis zur Halbsättigung (0,5) zugegeben wurde. Zur vollständigen Fällung Aufbewahrung im Eisschrank bei 4°C . Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und in Wasser, höchstens ein Drittel der ursprünglichen Flüssigkeitsmenge, aufgelöst, da bei der nun folgenden Behandlung mit Ammoniumsulfat bis nur 0,4-Sättigung umso mehr von der sauren Phosphatase mit den unerwünschten Begleiteiweißkörpern ausfällt, je verdünnter die Fermentlösung ist. Aufbewahrung 3 Tage bei 4°C . Die Lösung, von der Fällung befreit, wurde weiter mit Ammoniumsulfat versetzt (bis 0,55-Sättigung). Die Fällung wurde durch Zentrifugieren gewonnen, in 20 ccm Wasser aufgelöst und bei 4°C zwei Tage gegen oft gewechseltes Wasser dialysiert. Auf eine weitere Reinigung mit Ag-Azetat (15) wurde verzichtet.

So konnten 20 ccm einer hochaktiven Fermentlösung gewonnen werden, von der je 1 ccm ungefähr 1 g Prostata-trockengewebe entsprechen, da 175 g Organbrei ca. 20 g Trockensubstanz ergeben. Die Stammlösung wurde, nachdem 1 ccm zur Herstellung einer 1:100 verdünnten Fermentlösung entnommen worden war, in der Tiefkühltruhe bei -18°C aufbewahrt. Mit der verdünnten Prostata-Phosphatase (1:100) konnten sofort Aktivitätsbestimmungen durchgeführt werden, da das Ammoniumsulfat, das von der letzten Fällung im Präparat noch enthalten sein konnte, auch in höheren Konzentrationen die Aktivitätsbestimmung nicht stören soll (15).

B Zur biochemischen Aktivitätsbestimmung der alkalischen bzw. sauren Phosphomonoesterasen

Die Ergebnisse der Phosphatasebestimmung sind nicht nur von der Aktivität der Fermentlösung abhängig, sondern auch von der Art und Konzentration des Substrats, der H-Ionenkonzentration, der Temperatur und der Reaktionsdauer. Verschiedenheiten in auch nur einem dieser Faktoren ergeben zwangsläufig unterschiedliche Ergebnisse. Dies ist zu berücksichtigen, wenn man die Resultate dieser Arbeit untereinander, sowie diese mit den Ergebnissen anderer Autoren vergleicht.

Als Substrat werden Monophosphorsäureester verwendet, wie Phenylphosphat, Phosphotyrosin, α -, β -Glyzerophosphat, β -Naphtylphosphat, p-Nitrophenylphosphat, Phenolphthaleinphosphat, Phosphorsäureester des Fluoresceins, Eosins und des 4-Methyl-7-oxycumarins.

In den nachstehenden Ausführungen beschränken wir uns darauf, die bei unseren Untersuchungen angewandte Methodik der sauren und alkalischen Phosphatasebestimmung mit N a t r i u m - P h e n o l p h t h a l e i n - P h o s p h a t nach H U G G I N S und T A L A L A Y (12) als Substrat näher zu besprechen. Die Vorversuche wurden mit P h e n y l p h o s p h a t nach der Methode von K I N C und A R M S T R O N G (13) durchgeführt, aber später zugunsten des Phenolphthalein-Phosphats wieder verlassen. Diese Methode erlaubt es, von der aus dem Phenolphthalein-Phosphat bei 37°C durch die hydrolysierende Wirkung der Phosphatase (sauer, alk.) freigesetzten Menge P h e n o l p h t h a l e i n auf die Phosphatase-Aktivität zu schließen. Aus der gepufferten Lösung des farblosen Esters muß aber erst durch Abspaltung von zwei Phosphatgruppen die Entstehung einer Chinoidstruktur ermöglicht werden, die die typische rote Farbe im alkalischen Gebiet bedingt (s. unten). Die saure Phos-

phatase wird in einem Essigsäure-Azetat-Puffer von pH 5,4, die alkalische in einem Barbitursäure-Puffer von pH 9,7 bestimmt. Durch Zugabe eines Glykokoll-Puffers von pH 11,2 erhält die Reaktionslösung ein pH von 10,6 - 10,9, wodurch die Reaktion unterbrochen wird. Eine zusätzliche starke Hemmwirkung auf das Enzym übt das dem Glykokoll-Puffer zugesetzte P y r o p h o s p h a t aus.

Das als Substrat verwendete Phenolphthalein-Phosphat wurde von der Firma Merck bezogen. Es enthält zwar kein freies Phenolphthalein, ist aber nicht ganz frei von anorganischem Phosphat. Für die Phosphatase-Bestimmung ist ein hoher anorganischer Phosphatgehalt unerwünscht, da Phosphationen in höherer Konzentration hemmend auf die saure und alkalische Phosphatase einwirken (24). Das nach der Originalvorschrift von H U G G I N S und T A L A L A Y (12) selbst dargestellte Phenolphthalein-Phosphat konnte nicht so rein wie das käufliche Präparat erhalten werden. Es enthielt noch Spuren von Phenolphthalein und war vor allem nicht so beständig.

V e r w a n d t e L ö s u n g e n :

a) Saure Puffersubstratlösung pH 5,4

11,7 g Na-Azetat ($\text{NaCH}_3\text{CO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)

0,79 ccm 99%iger Eisessig in Aqua dest.

gelöst, 0,608 g Na-Phenolphthalein-Phosphat (oder 0,7226 g Colamin-Phenolphthalein-Phosphat), ad 100 ccm aufgefüllt.

Nach Zugabe von 7,5 ccm Chloroform im Eisschrank aufbewahren. Substratkonzentration ist 0,001 molar und ohne Einfluß auf die Fermentaktivität.

b) Alkalische Puffersubstratlösung pH 9,7

20,6 g Veronal-Natrium

0,608 g Na-Phenolphthalein-Phosphat

(oder 0,7226 g Colamin-Phenolphthalein-Phosphat) auf 100 ccm Aqua dest. auf-

füllen, dazu 7,5 ccm Chloroform. Eisschrank.

- c) Glykokoll-Puffer pH 11,2
 9,19 g Glykokoll
 7,17 g NaCl
 15 ccm conc. NaOH auf etwa 1 Liter auffüllen, dazu 40 g gepulvertes Na-Pyrophosphat, dann genau auf 1 Liter auffüllen. Aufbewahrung bei Zimmertemperatur.
- d) Hemmlösung für die saure Phosphatase
 Gesättigte NaF-Lösung (4%ig)
- e) Hemmlösung für die alkalische Phosphatase
 Gesättigte Na_2HAsO_4 -Lösung
- f) Phenolphthalein-Stammlösung
 100 mg Phenolphthalein in 100 ccm reinem, 96%igem Äthylalkohol lösen.

A u s f ü h r u n g :

Zu 4,5 ccm Substratlösung und 1 ccm H_2O bzw. 1 ccm Hemmlösung (d bzw. e) - im Reagenzglas auf 37°C vorgewärmt - werden 0,5 ccm Fermentlösung zugegeben, gut vermischt und 60 Min. bei 37°C im Thermostaten bebrütet. Nach Zugabe von 4 ccm Glykokoll-Puffer (c) und gutem Mischen wurde jeweils beim Ansatz sofort photometriert, um möglichst genaue Extinktionswerte zu erhalten. Es stellte sich nämlich heraus, daß die Farbsintensität auch bei einem pH v. 10,9 nach einiger Zeit etwas absank. Zur Extinktionsmessung diente das E p p e n - d o r f - P h o t o m e t e r "M e d e o r" (1 cm Cuvette, 546 m μ Filter, Photozelle 9r).

Besondere Abänderungen der Versuchsansätze wurden jeweils bei den einzelnen Versuchen angegeben. Die verwandten Fermentmengen wurden entweder aus einer im Eisschrank vorrätig gehaltenen Enzymlösung 1%ige alkalische Phosphatase) entnommen oder aus einer verdünnten Fermentlösung (saure Phosphatase 1:100 verd.) jeweils frisch hergestellt. Wie oben erwähnt, hängt die Genauigkeit der Untersuchungsergebnisse von vielen Faktoren (pH usw.) ab; dazu kommt also jetzt noch die Schwierigkeit, bei all den Versuchsansätzen mit einer Fermentlösung von immer derselben Phosphatase-Aktivität zu arbeiten. Obwohl wir bestrebt waren, durch genaues

Arbeiten - genaues Einstellen des pH-Wertes der Puffer-Lösungen mit Hilfe der Glaselektrode (pH-Ionostat Kordatzki - Lautenschläger), Verwendung von immer denselben Glasgeräten, die durch Behandlung mit Chromschwefelsäure, Ausspülung mit Aqua dest., Trocknen bei 160°C, möglichst säure- und alkalifrei gemacht wurden - in Frage kommende Ungenauigkeiten auf ein Minimum zu beschränken, konnten doch nicht immer identische Aktivitätswerte erzielt werden. Jedoch hielten sich die Schwankungen der jeweils den Versuchen parallel laufenden Fermentaktivitätswerte in einem Rahmen, der es erlaubte, sie als brauchbare Vergleichswerte für Hemmansätze anzusehen.

Phenolphthalein - Eichkurve

Von der Phenolphthalein-Stammlösung (f) werden 0,2,4,8,10 und 20 ccm (entspricht 0,2,4,8,10 und 20 mg Phenolphthalein) mit Aqua dest. auf 1 Liter aufgefüllt (Eichlösung). Zu je 5 ccm dieser Lösungen fügt man 1 ccm H₂O und 4 ccm Glykokoll-Puffer (c) hinzu und kolorimetriert sofort. Die erhaltenen Extinktionswerte entsprechen dann 0,2,4,8,10 und 20 mg Phenolphthalein pro Liter der Eichlösung (bzw. 0,1,2,4,5 und 10 mg Phenolphthalein pro Liter Ansatzlösung). Die Extinktionswerte (Tab.1) werden in einem Koordinatensystem auf der Ordinate aufgetragen, die Anzahl mg Phenolphthalein pro Liter der Eichlösung auf der Abszisse. Man erhält so eine Gerade.

Tabelle 1

Ansatz	1	2	3	4	5	6
je 5ccm d.Eichlsg.	5 ccm	+	+	+	+	+
	H ₂ O					
Phenolphth.-Gehalt d.Ansätze in γ	$\emptyset$	10	20	40	50	100
Phenolphth.-Gehalt pro Lit. der kolorim.Flüss. in mg	$\emptyset$	1	2	4	5	10
1 ccm H ₂ O	+	+	+	+	+	+
4ccm Glykokoll-Puff.	+	+	+	+	+	+
Extinktionswerte	geg.0	0,094	0,183	0,350	0,440	0,870

Nach der Definition von HUGGINS und TALLALAY sind 10 Huggins-Einheiten (H.E.) die Enzymmenge, die ein kolorimetrisches Äquivalent von 1,0 mg Phenolphthalein bei einem Substratüberschuß in einer Stunde bei 37° C unter optimalen pH-Bedingungen aus 100 ccm Fermentlösung freisetzen.

Beispiel :

10 γ Phenolphthalein im Versuchsansatz entsprechen einem Extinktionswert von 0,094. Diese Extinktion wird auch von einem Ansatz gegeben, dessen Fermentlösung (0,5 ccm) 10 γ Phenolphthalein freisetzen.

Also 10 γ Phenolphthalein wurden von 0,5 ccm Fermentlösung freigesetzt.

2 mg Phenolphthalein wurden von 100 ccm Fermentlösung freigesetzt.

2 mg von 100 ccm Fermentlösung freigesetztem Phenolphthalein entsprechen definitionsgemäß 20 H.E.

Aus der Eichkurve werden die äquivalenten Phenolphthalein-Konzentrationen in γ /10 ccm Versuchsansatz abgelesen. Dieser Wert ist mit 2 zu multiplizieren und die äquivalenten Huggins-Einheiten pro 100 ccm Fermentlösung sind direkt aus der Eichkurve zu entnehmen.

Die Farbbildung bei der Bestimmung der Phosphatase-Aktivität ist, wie schon erwähnt, nicht der Enzymkonzentration proportional, da vom Phenolphthalein-Phosphat erst zwei Phosphatgruppen abgespalten werden müssen, bevor die Farbe im alkalischen Milieu erscheint. Setzt man die Fermentkonzentration in Beziehung zu der Menge photometrisch gemessenem, freigesetztem Phenolphthalein, so erhält man nur dann eine Gerade, wenn man nach LUKHARDT und WALTER (18) die Werte in ein doppeltlogarithmisches Koordinatensystem einträgt. - In einem gewöhnlichen Koordinatensystem eingetragen, erhält man eine parabolische Kurve. -

Wir **beschränken** uns darauf, die Phosphatase-Aktivität jeweils nur einfach umgerechnet nach H U G - G I N S anzugeben, da es uns nur auf die Relativwerte ankommt. Bei den Hemmversuchen verzichten wir ganz auf eine Umrechnung der Extinktionswerte. Sie zeigen die Unterschiede, auf die es ankommt, sehr deutlich.

Da die saure Phosphatase aus der Prostata und die alkalische Phosphatase aus Schweineniere für die späteren Versuche verwendet werden sollen, seien hier die Untersuchungen über die Abhängigkeit der Fermentaktivität vom Verdünnungsgrad kurz wiedergegeben.

S a u r e P h o s p h o m o n o e s t e r a s e
(aus Prostata)

Die Fermentlösung wurde in Verdünnungen von 1:160 bis 1:1280 verwandt, bezogen auf die Stammlösung. Als Hemmsubstanz diente gesättigte NaF-Lsg(d).

Tabelle 2

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Verdünnungsgrad d. Enzymlösung		1/160	1/320	1/400	1/400	1/400	1/640	1/800	1/800	1/800	1/1280	1/160	1/320	1/400
4,5ccm Substratlsg.(a)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,0ccm H ₂ O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0
1,0ccm NaF-Lsg.(d)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+
0,5ccm s. P'tase-Lsg.	H ₂ O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 Std. bei 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4,0 ccm Glykokoll-P.(c)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ext.-Werte sofort, pH 10,86	0,016	0,960	1,365	1,060	1,140	1,120	0,650	0,290	0,348	0,310	0,220	0,042	0,015	0,015
Ext.-Werte nach 20 Min.				0,810	0,740	0,720		0,210	0,265	0,266				

Die Zeit von 1 Stunde für die Inkubation wurde für jeden Versuchsansatz genau eingehalten, was zur Erzielung exakter Werte sehr wichtig ist. Die Farbinintensität des freigesetzten Phenolphthaleins soll nach H U G G I N S und T A L A L A Y (12) im pH-Bereich von 10,9 stabil sein. Wir konnten das nicht bestätigen, obwohl der vorgeschriebene pH-Wert in der Kolorimeterflüssigkeit von 10,8-11,0 erreicht wurde.

Wie die Extinktionswerte (Tab.2, Ansatz 4,5,6,8, 9,10) zeigen, nahm die Farbinintensität nach 20 Minuten beträchtlich ab. Weiter ist aus der Tabelle zu ersehen, daß bei allen Ansätzen die Extinktionswerte nicht proportional der Verdünnung sind. Die Extinktionen sind immer kleiner als die Hälfte (Verd. 1:2!) der Extinktionen der jeweils vorherigen Ansätze. Das hängt damit zusammen, daß die Wahrscheinlichkeit der vollständigen Befreiung des Phenolphthalein-Phosphats von den beiden Phosphatgruppen mit der Konzentration des Ferments zunimmt. Diese Tatsache wurde auch bei allen anderen Verdünnungsserien (s.unten) beobachtet. Das macht verständlich, daß man mit der "e i n f a c h e n U m r e c h n u n g" nach H U G G I N S niemals absolute Werte erhalten kann. - Durch den NaF-Zusatz tritt beinahe eine vollständige Hemmung der sauren Phosphatase ein.

Zur Berechnung der Phosphatase-Aktivität wurden aus den Extinktionswerten der Ansätze 4-6 nach Abzug des Hemmwertes v.14 der Durchschnittswert ermittelt und mit Hilfe der Eichkurve die H.E. pro 100 ccm der ursprünglichen Fermentlösung berechnet. Der Durchschnittswert von 1,087 entspricht 124,5 % im Ansatz freigesetztem Phenolphthalein. Das sind 249 H.E. pro 100 ccm verdünnter Fermentlösung (1:400). Die ursprüngliche Enzymlösung (100 ccm) besitzt demnach eine Aktivität von 99600 Huggins-Einheiten. Dieselbe Aktivität weisen 100 g getrocknetes Drüsengewebe auf (vgl.Darst.).

Alkalische Phosphomonoesterase (aus Schweineniere)

Die alkalische Phosphatase wurde zur Untersuchung ihrer Aktivität bis 1:100 verdünnt, bezogen auf die Stammlösung (1%ig). Als Hemmsubstanz diente gesättigte Na_2HAsO_4 -Lösung (c).

Tabelle 3

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Verdünnungsgrad der Enzym-lsg.				1/2	1/4	1/10	1/40	1/80	1/100		
4,5 ccm Substrat-lsg. (b)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,0 ccm H_2O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
1,0 ccm Hemmlsg. (e)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+
0,5 ccm alk. P'tase-Lsg.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 Std. bei 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4,0 ccm Glykokoll-Puffer (c)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ext.-Werte sofort	0,980	0,945	0,955	0,245	0,116	0,050	0,016	0,010	0,007	0,008	0,007

Hier konnten entsprechende Verhältnisse wie bei der sauren Phosphatase festgestellt werden. Es besteht keine Proportionalität zwischen Verdünnungsgrad und Extinktionswert. - Durch Zusatz von Na_2HAsO_4 trat beinahe eine vollständige Hemmung der Phosphatase-Aktivität ein.

Berechnung der Aktivität: Nach Abzug des Extinktionswertes des Hemmansatzes (0,008) von der durchschnittlichen Extinktion der Ansätze 1,2,3 (0,960) kann der erhaltene Wert (0,952) wiederum mit Hilfe der Eichkurve in 107,3 γ freigesetztes Phenolphthalein pro 10 ccm kolorimetrierter Flüssigkeit umge-

Die Zeit von 1 Stunde für die Inkubation wurde für jeden Versuchsansatz genau eingehalten, was zur Erzielung exakter Werte sehr wichtig ist. Die Farbin-
tensität des freigesetzten Phenolphthaleins soll nach
H U G G I N S und T A L A L A Y (12) im pH-Bereich
von 10,9 stabil sein. Wir konnten das nicht bestäti-
gen, obwohl der vorgeschriebene pH-Wert in der Kolo-
rimeterflüssigkeit von 10,8-11,0 erreicht wurde.

Wie die Extinktionswerte (Tab.2, Ansatz 4,5,6,8,
9,10) zeigen, nahm die Farbtensität nach 20 Minuten
beträchtlich ab. Weiter ist aus der Tabelle zu erse-
hen, daß bei allen Ansätzen die Extinktionswerte nicht
proportional der Verdünnung sind. Die Extinktionen
sind immer kleiner als die Hälfte (Verd. 1:2!) der Ex-
tinktionen der jeweils vorherigen Ansätze. Das hängt
damit zusammen, daß die Wahrscheinlichkeit der voll-
ständigen Befreiung des Phenolphthalein-Phosphats von
den beiden Phosphatgruppen mit der Konzentration des
Ferments zunimmt. Diese Tatsache wurde auch bei allen
anderen Verdünnungsserien (s.unten) beobachtet. Das
macht verständlich, daß man mit der "e i n f a c h e n
U m r e c h n u n g" nach H U G G I N S niemals ab-
solute Werte erhalten kann. - Durch den NaF-Zusatz
tritt beinahe eine vollständige Hemmung der sauren
Phosphatase ein.

Zur Berechnung der Phosphatase-Aktivität wurden
aus den Extinktionswerten der Ansätze 4-6 nach Abzug
des Hemmwertes v.14 der Durchschnittswert ermittelt
und mit Hilfe der Eichkurve die H.E. pro 100 ccm der
ursprünglichen Fermentlösung berechnet. Der Durch-
schnittswert von 1,087 entspricht 124,5 γ im Ansatz
freigesetztem Phenolphthalein. Das sind 249 H.E. pro
100 ccm verdünnter Fermentlösung (1:400). Die ursprüng-
liche Enzymlösung (100 ccm) besitzt demnach eine Akti-
vität von 99600 Huggins-Einheiten. Dieselbe Aktivität
weisen 100 g getrocknetes Drüsengewebe auf (vgl.Darst.).

Alkalische Phosphomonoesterase (aus Schweineniere)

Die alkalische Phosphatase wurde zur Untersuchung ihrer Aktivität bis 1:100 verdünnt, bezogen auf die Stammlösung (1%ig). Als Hemmsubstanz diente gesättigte Na_2HAsO_4 -Lösung (c).

Tabelle 3

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Verdünnungsgrad der Enzymlsg.				1/2	1/4	1/10	1/40	1/80	1/100		1/2
4,5 ccm Substratlsg. (b)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,0 ccm H_2O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
1,0 ccm Hemmlsg. (e)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+
0,5 ccm alk. P'tase-Lsg.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 Std. bei 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4,0 ccm Glykokoll-Puffer (c)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ext.-Werte sofort	0,980	0,945	0,952	0,245	0,116	0,050	0,016	0,010	0,007	0,008	0,007

Hier konnten entsprechende Verhältnisse wie bei der sauren Phosphatase festgestellt werden. Es besteht keine Proportionalität zwischen Verdünnungsgrad und Extinktionswert. — Durch Zusatz von Na_2HAsO_4 trat beinahe eine vollständige Hemmung der Phosphatase-Aktivität ein.

Berechnung der Aktivität: Nach Abzug des Extinktionswertes des Hemmansatzes (0,008) von der durchschnittlichen Extinktion der Ansätze 1,2,3 (0,960) kann der erhaltene Wert (0,952) wiederum mit Hilfe der Eichkurve in 107,3 % freigesetztes Phenolphthalein pro 10 ccm kolorimetrierter Flüssigkeit umge-

rechnet werden. 100 ccm der 1%igen Fermentlösung weisen also eine Aktivität von 214,6 H.E. auf. Auf das Frischorgan umgerechnet, haben 100 g Schweinenieren-Trockensubstanz eine Phosphatase-Aktivität von ca. 105,6 H.E. (Wenn man annimmt, daß das Frischorgan (1700 g) 10% Trockensubstanz enthält.)

Die alkalische Phosphatase wurde nur für histochemische Versuche, nämlich zum Nachweis phosphatasehemmender Strukturen, verwendet (s. diesen Abschnitt).

C Zur Frage der histo-chemischen Nachweisbarkeit
spezifischer Hemmstoffe für saure und alkali-
sche Phosphomonoesterasen in tuberkulösem
Hautgewebe (Lupus vulgaris)

Histo-chemisches Verhalten der Phosphatasen in tuberkulösen Strukturen.

Bei einem tuberkulösen Infekt werden durch die besonderen stofflichen Eigenschaften des Erregers, nach ROULET (27) durch deren Phosphatide, charakteristische Gewebsreaktionen ausgelöst, die in der Entwicklung des sogenannten tuberkulösen Granuloms ihren morphologischen Ausdruck finden. Bei der Vernichtung der Erreger durch Phagozyten, und den anschließenden intrazellulären Abbau werden zweifelsohne enzymatische Prozesse eine große Rolle spielen.

Es soll lediglich das Verhalten der Phosphomonoesterasen besprochen werden, ohne die anderen nicht minder wichtigen Fermentsysteme zu berühren. Eine eingehende Kenntnis der enzymatischen Leistung verschiedener Zellelemente hinsichtlich ihrer Phosphatase-Produktion und die Lokalisation der Phosphatase im tuberkulösen Granulom ist zum Verständnis später zu besprechender Versuchsergebnisse unerlässlich.

An Hand der Tabelle 4 soll die P h o s p h a -
 t a s e - V e r t e i l u n g bei der menschlichen Tuberkulose nach den Ergebnissen von G Ö S S N E R (7) erläutert werden.

Tabelle 4

	alk. Phosph.	s. Phosph.	
Epitheloidzellen	0	(+)	
Riesenzellen	0	++	
Verkäsung	0	+	+++ stark
Histiozyten	0	0	++ deutl.
Retikulumzellen	0	0	(+) schwach
Fibroblasten	+++	0	oder inkonst.
Alveolardeckzellen	(+)	(+)	0 fehlt
Kapillärwände	+++	0	

Nach G Ö S S N E R ist die Verteilung der untersuchten Fermente im tuberkulösen Granulom des Menschen verhältnismäßig konstant. Die a l k a l i s c h e P h o s p h a t a s e kommt weder in Epitheloid-, Riesen- zellen noch im käsigen Material vor. Allerdings soll in der Umgebung des Tuberkels, wo Fibroblasten auftreten und sich eine fibröse Umwandlung bemerkbar macht, eine starke Aktivität der alkalische Phosphatase feststellbar sein. Auch in den Kapillarwänden in der Nachbarschaft des Tuberkels und in den neugebildeten Fasern ist, wie allgemein in Kapillarwänden, eine alkalische Phosphatase nachweisbar.

Die s a u r e P h o s p h a t a s e ist das einzige Enzym, das auch innerhalb von verkästen Herden, allerdings in unterschiedlicher Intensität und fleckiger Verteilung, zu finden ist. Die Anwesenheit von saurer Phosphatase im Stratum corneum soll nach S P I E R , P A S C H E R und M A R T I N (30) eine Begleiterscheinung des Keratinierungsprozesses sein. Daneben enthalten auch Riesen- zellen dieses Enzym in größerer Menge, während die Epitheloidzellen nur eine schwache Reaktion geben.

Bei den von Natur aus tuberkulose-resistenten Tierarten, wie Ratte und Maus, ist in den mononukleären Phagozyten von tuberkulösen Herden reichlich saure Phosphatase lokalisierbar; beim Kaninchen sind in derselben Zellart nur geringe Mengen und beim Meerschweinchen ist überhaupt keine saure Phosphatase nachweisbar. Allerdings enthielten die käsigen Nekrosen bei dieser empfindlichen Tierart und beim Kaninchen reichlich saure Phosphatase, was eventuell auf einen früheren Gehalt der Nekrosen an polymorphkernigen Leukozyten schließen lassen könnte, weil diese Zellen reichlich Mengen desselben Enzyms aufweisen.

G R O G G und P E A R S E (9) nehmen an, daß das P h o s p h a t i d der Tuberkelbazillen als Substrat für die saure Phosphatase der mononukleären Phagozyten dienen könnte. Besonders deshalb, weil die Zellen bei Maus und Ratte eine saure Reaktion zeigen. Nach

den Versuchen von G E R S T L , T E N N A N T u.a. (6) kann man weiter annehmen, daß die mononukleären Phagozyten von tuberkulose-empfindlichen Tieren (Meerschweinchen) unfähig sind, Phosphatid abzubauen. Zur Frage der natürlichen Resistenz gegenüber Tuberkulose meinte G Ö S S N E R weiter: "Die Enzymausrüstung der Epitheloidzellen wird besonders aufschlußreich sein, da diesen Zellelementen vor allem die Verarbeitung der Erreger zugesprochen wird". Von Natur aus tuberkulose-resistente Tierarten, wie Ratte und Maus, bei denen unter gewöhnlichen Bedingungen keine echten Epitheloidzellen entwickelt werden, sondern nur geblähte Schaumzellen, zeigen in den Herden eine hohe saure Phosphatase-Aktivität. Bei besonders empfindlichen Arten (Meerschweinchen) fehlt die saure Phosphatase.

Wenn auch noch keine exakte Deutung dieser Befunde möglich ist (G Ö S S N E R 7), stehen sie doch mit der Annahme von G R O G G und P E A R S E im Einklang, daß die Phosphatid-Verbindungen des Tuberkelbazillus als Substrat für die saure Phosphatase in den Epitheloidzellen der resistenten Arten dienen können. Die Tatsache, daß mit Tuberkulostatika vorbehandelte Gewebsschnitte (außer Streptomycin) keine Abschwächung der Aktivität der sauren Phosphatase zeigten - sie riefen also keine irreversible Inaktivierung des untersuchten Enzyms hervor - , steht mit dieser Deutung nicht im Widerspruch.

Die geringe Aktivität oder das Fehlen des gleichen Enzyms bei den anfälligen Arten ließe darauf schließen, daß der Abbau des Tuberkelbazillus deshalb wesentlich langsamer vor sich geht. Aber nicht nur das Fehlen der sauren Phosphatase könnte das zur Folge haben, sondern auch eine Hemmung des Enzyms durch bestimmte chemische Substanzen.

Mit D e s o x y r i b o n u k l e i n s ä u r e (DNS) konnte O H L M E I E R (20) in vitro unter bestimmten Bedingungen eine teilweise Inaktivierung

der sauren Phosphatase nachweisen. Die DNS kommt im tuberkulösen Granulom frei vor (s. S.21); woher dieser Stoff stammt, ist bis jetzt noch nicht mit Sicherheit ermittelt worden (G Ö S S N E R). Wahrscheinlich tritt im tuberkulösen Käse ein Kernzerfall ein, und möglicherweise kommt DNS in Geweben frei vor, die auch in vivo bei einem bestimmten pH-Wert eine Hemmung der sauren Phosphatase bedingen. Daß diese Hemmung durch die DNS für die verringerte Abwehrlage des Gewebes verantwortlich zu machen ist, ist möglich.

Als Beitrag zur Klärung dieser Vermutung sollen die in den folgenden Abschnitten wiedergegebenen Versuche dienen (s. Abschnitt C 2,3,4,5).

Darstellung und Reinigung der DNS aus Kalbsthymus

Zum Nachweis der Hemmbarkeit der sauren Phosphatase mittels DNS wurde eine niedermolekulare Form (b), die uns von den Farbwerken Bayer überlassen worden war, und eine hochmolekulare Form (a) der DNS verwandt. Die hochpolymere, gelatinierende Form wird durch ein Ferment, die N u k l e o g e l a s e (D N S - D e p o l y m e r a s e) in die niedermolekulare, nicht gelatinierende Form (b) übergeführt. Die Form a mußte, da sie wegen ihrer langwierigen Darstellungsweise und ihrer relativ geringen Haltbarkeit von der chemischen Industrie nicht zu beziehen war, selbst hergestellt werden.

Auf eine nähere Beschreibung des Arbeitsganges wird hier verzichtet, da die Darstellung genau nach Vorschrift von H. S C H W A N D E R und R. S I G - N E R (Einzelheiten s. dort 28) erfolgte. Im folgenden sei nur auf das Prinzip der Darstellung eingegangen:

Brei von T h y m u s g e w e b e (215 g) wird in molarer NaCl-Lösung aufgelöst. Zur Hemmung der verschiedenen Fermentsysteme wird der Reinigungsprozeß bei 0°C durchgeführt und jeweils Na-Citrat beigegeben. Durch Verdünnen der Flüssigkeit mit Wasser tritt eine

Fällung des Nukleoproteins in faseriger Form ein. Eine zweimalige Umfällung des Nukleoproteins - auflösen in molarer Kochsalz-Lösung und Ausfällung durch Verdünnen mit Wasser - hat vor allem die Entfernung des Ribo-Nukleoproteins aus dem Zellplasma zum Ziel. Abermaliges Auflösen in 10%iger NaCl-Lösung. Danach wird durch Zugabe von Kochsalz bis zur Sättigung unerwünschtes Eiweiß ausgefällt, das mittels Celite-Filterhilfsmittel von der Flüssigkeit abgetrennt wird. Die Lösung wird in Alkohol eingegossen. Das Na-Thymonukleinat fällt aus. Die faserige Substanz wird in Wasser aufgelöst und in Alkohol ausgefällt. Das Na-Thymonukleinat wird mit Alkohol von steigender Konzentration behandelt und dadurch entwässert.

Man erhält eine schneeweiße, asbestartige, faserige Substanz (2 g), die in einem Glasgefäß über gesättigter NaCl-Lösung aufbewahrt wird. Beim Auflösen einer Probe in Wasser löst sich die Substanz zu einem wasserklaren Gel.

Zur histo-chemischen Nachweisbarkeit der desoxyribonukleinsäure (DNS) im verkästen tuberkulösen Gewebe mittels F E U L G E N F Ä R B U N G

Prinzip: Die in der DNS vorhandene Verbindung Desoxyribose - Purinbase wird durch milde saure Hydrolyse gelöst, wodurch die endständige Aldehygruppe des Kohlehydratrestes frei wird. Diese gibt mit dem S c h i f f s c h e n R e a g e n s , der farblosen fuchsinschweifigen Säure, eine rotviolette Farbreaktion. Da bei der Hydrolyse die Verbindung Ribose - Purinbase nicht gelöst wird, fällt die Reaktion bei der Ribonukleinsäure negativ aus. Die Nuklealfärbung nach Feulgen findet nur dort statt, wo DNS anwesend ist; sie gilt für das in der DNS vorhandene Kohlehydrat, die Desoxyribose.

Einzelheiten der Nuklealfärbung s. R O M E I S (23)

Für 10 μ dicke, formolfixierte Paraffinschnitte erwies sich in Vorversuchen eine Hydrolysendauer von 15 Min. bei 60°C als optimal. Die Einhaltung optimaler Bedingungen ist wichtig, um in den mikroskopischen Schnitten auch geringe Mengen von DNS fest-

stellen zu können. Wird die Hydrolyse über 15 Min. hinaus fortgesetzt, so nimmt die Intensität der Farb-reaktion immer mehr ab. Dasselbe Ergebnis wurde mit einer DNS-Aufschwemmung erzielt, wobei das Optimum der Rotfärbung kolorimetrisch festgestellt wurde.

Bei den Färbungen wurden stets Kontrollschnitte mitgeführt, die keiner Hydrolyse unterworfen wurden. - Nur kurzes Eintauchen in kalte in HCl. - Sie erwiesen sich durchwegs als ungefärbt.

Von 20 untersuchten *Lupus vulgaris*-Präparaten von verschiedenen Patienten konnte in einem Falle in der Randzone eines Tuberkels eine diffuse Rötung, d.h. eine positive Feulgen-Reaktion nachgewiesen werden. In einem anderen Präparat ließ das histologische Bild zentrale Kerntrümmer im Tuberkel wahrscheinlich erscheinen.

Im histologischen Schnitt eines *tuberkulösen Lymphoms* (Axillardrüse), das homogene käsige Massen mit minimalen Resten von Lymphgewebe in der Peripherie, Fibroblastendurchsetzung der homogenen Massen zeigte, war in der Detritusrandzone DNS außerhalb von Zellstrukturen nachweisbar.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß DNS in tuberkulösem Gewebe außerhalb von Zellen frei vorkommen kann.

DNS als Hemmer der sauren Phosphatase (Versuche in vitro)

Nach O H L M E I E R (20) geht die Prostata-Phosphatase bei einem pH von $<4,5$ mit isolierten Zellkernen eine Verbindung ein; dabei bleibt eine Restaktivität des Fermentes von nur etwa 13% erhalten. Wird der pH-Wert vergrößert oder das Ferment durch zugesetztes Eiweiß (protamin, Salmin oder Protein E) von der Nukleinsäure verdrängt, so wird die Phosphatase mit voller Aktivität wieder in Freiheit gesetzt. Durch DNS kann also die Tätigkeit von Enzymen je nach H-Ionenkonzentration und je nach Menge und Art konkurrierender Eiweißkörper beeinflußt werden.

In t u b e r k u l ö s e n N e k r o s e h e r d e n und auch bei anderen Formen des Gewebszerfalls, z.B. beim I n f a r k t (20) finden sich Nukleinsäuren in freier, d.h. nicht kerngebundener Form vor. Wir konnten das bestätigen (s.S.21). Die außerhalb von Zellstrukturen vorkommende DNS soll nach O H L - M E I E R in Abhängigkeit von der H-Ionenkonzentration die Aktivität der sauren Phosphatase in tuberkulösen Käseherden beeinflussen; eine Angabe, die an Hand nachstehender in-vitro-Versuche nachgeprüft werden soll.

V e r w a n d t e L ö s u n g e n :

c und d siehe oben.

g) Saure Phosphatase aus Prostata (1:400; 1:200 usw. verd.)

h) Wässrige b-DNS-Lösung (Zahlenangaben beziehen sich auf mg DNS/Ansatz)

i) Saure Puffersubstratlösung pH 3,7; sonst wie bei a.

j) Saure Puffersubstratlösung pH 3,7 (1n Na-Azetat, 1n Essigsäure); sonst wie bei a. (s.auch Text)

k) Glykokoll-Puffer pH 11,2; von größerer Ionenstärke (s.S.24)

Tabelle 5

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7
4,0ccm Substratlsg.(i)	+	+	+	+	+	+	Substratlsg.(a)
0,5ccm b-DNS-Lsg.(h)	0	0	0,5	0,05	0,005	0	0
0,5ccm H ₂ O	+	+	0	0	0	0	+
Q,5ccm aF-Lsg. (d)	0	0	0	0	0	+	0
0,5ccm s. P'tase-Lsg. 1:400 (g)	+	+	+	+	+	+	+
1 Std.b.37°C	+	+	+	+	+	+	+
5,0ccm Glykokoll-P.(c)	+	+	+	+	+	+	+
Ext.-Werte sofort, pH 10,9	0,022	0,022	0,023	0,022	0,024	0,020	1,140

Die Extinktionswerte der Ansätze 1-6 (Tab.5) liegen im Bereich der Blindwerte. Jedoch wies die verwandte PhosphataseLösung bei einem pH von 5,4 die früher (s.Tab.2) festgestellte Aktivität auf, wie die Extinktion 7 zeigt. O H L M E I E R führte seine Hemmversuche mit einem Citratpuffer von pH 3,7 durch. Er konnte damit besonders gut das 2.Aktivitäts-Maximum der sauren Phosphatase darstellen. Offenbar ist demnach die Versuchsbedingung nicht geeignet, die eine Aktivität des verwendeten Fermentes bei pH 3,7 in Erscheinung treten zu lassen.

Nach R O S E N M U N D (24) ist es nur dann möglich, das zweite Aktivitäts-Maximum nachzuweisen, wenn die Fermentansätze mit "gewöhnlicher", d.h. nicht isoionischer Essigsäure-Azetat-Pufferlösung gepuffert werden. Man muß also Pufferlösungen verwenden, die durch Mischen von 1n Essigsäure und 1n Na-Azetat hergestellt wurden (j). Es ist somit außer der Art des Puffers auch dessen Ionenstärke von wesentlichem Einfluß auf die saure Phosphatase-Aktivität.

Die nächsten Tabellen zeigen die Ergebnisse der Ansätze bei Verwendung einer Pufferlösung mit einer größeren Ionenstärke. Zu 100 ccm dieses Puffers wurden 60,8 mg P h e n o l p h t h a l e i n p h o s - p h a t zugegeben. Da die Pufferkapazität der Substratlösung um vieles größer ist als die der vorher verwandten (i), mußte man zur Unterbrechung der Phosphatasetätigkeit einen Glykokollpuffer mit einer entsprechenden Ionenstärke herstellen. Es ist nicht möglich, 9,19 g Glykokoll, 7,17 g NaCl, 15 ccm conc. Natronlauge und 4 g Na-Pyrophosphat auf 100 ccm Wasser zu lösen; es wurde deshalb weiter auf 500 ccm aufgefüllt und durch weitere Zugabe von NaOH mit dem pH-Ionostaten ein pH von 11,2 eingestellt (k). Um das gewünschte pH von ca. 10,9 in der Kolorimetrierflüssigkeit zu erreichen, wurden anstatt 5ccm 15ccm Glykokollpuffer zu 5 ccm Inkubationsflüssigkeit hinzugegeben.

Durch Verdoppelung der Extinktionswerte (20 ccm) wurden die Extinktionen auf 10 ccm kolorimetrierter Flüssigkeit bezogen.

Tabelle 6

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8	9
4,0ccm Substratlsg. (j)	+	+	+	+	+	+	+	Substratlsg. (a)	
0,5ccm b-DNS-Lsg. (h)	0	0	5	0,5	0,05	0,005	0	0	0
0,5ccm H_2O	+	+	0	0	0	0	0	+	+
0,5ccm NaF-Lsg. (d)	0	0	0	0	0	0	+	0	0
0,5ccm s.									
P'tase-Lsg. 1:400 (g)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 Std. b. 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15,0ccm Glykokoll-P. (k)	+	+	+	+	+	+	+	5ccm Glykokoll-P. (c)	
Ext.-Werte bezogen auf 10ccm, sof. pH 10,9	0,350	0,310	0,260	0,260	0,270	0,304	0,006	1,138	1,140

Bei Verwendung einer nicht isoionischen Substratpufferlösung ist eine Hemmung der sauren Phosphatase durch DNS (Form b) festzustellen, wenn auch nicht in dem Ausmaß wie von O H L M E I E R berichtet (Tab.6). Dabei scheint bereits bei 0,5 mg DNS pro Ansatz eine maximale Hemmung erreicht worden zu sein. Die Aktivität des Fermentes ist im Puffermilieu von pH 3,7 (s.auch andere Versuchsbedingungen) nicht so groß wie in einer Substratlösung von pH 5,4, wie der Vergleich der Extinktionen von 1 und 2 mit 8 und 9 zeigt. Die kompetitive Hemmung der sauren Phosphatase ist beinahe eine vollständige (s. Ans.7).

Die dritte Versuchsreihe (Tab.7) wird unter denselben Bedingungen und mit Ausnahme der Enzymverdünnung (1:200) mit denselben Lösungen vorgenommen wie in Tab. 6. Bei Vergleich der einzelnen Werte sind daher auch ähnliche Ergebnisse zu erkennen.

Tabelle 7

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8	9
4,0ccm Substratlsg. (j)	+	+	+	+	+	+	+	Substratlsg. (a)	
0,5ccm b-DNS-Lsg. (h)	0	0	5	0,5	0,05	0,005	0	0	0
0,5ccm H ₂ O	+	+	0	0	0	0	0	+	+
0,5ccm NaF-Lsg. (d)	0	0	0	0	0	0	+	0	0
0,5ccm s. P'tase-Lsg. 1:200 (g)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 Std. b. 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15,0ccm Glykokoll-P. (k)	+	+	+	+	+	+	+	5ccm Glykokoll-P. (c)	
Ext.-Werte bezogen auf 10ccm, sof., pH 10,9	0,920	0,950	0,660	0,664	0,680	0,930	0,040	über 2	über 2

Im folgenden (Tab.8) wird an Stelle der niederpolymeren Form b, die hochpolymere, visköse Form a der DNS (l) verwandt; außerdem C o l a m i n - P h e n o l p h t h a l e i n - P h o s p h a t in der Substratlösung (s. Seite 9: a) anstatt D i n a t r i u m - P h e n o l p h t h a l e i n - P h o s p h a t, da letzteres von der Firma Merck nicht mehr zu beziehen war. Sonstige Versuchsbedingungen wie oben.

Tabelle 8

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
4,0ccm Substratlsg. (j) s. auch Text	+	+	+	+	+	+	Substratlsg. (a)	
0,5ccm a-DNS-Lsg. (l)	0	0	0,5	0,05	0,005	0	0	0
0,5ccm H ₂ O	+	+	0	0	0	0	+	+
0,5ccm NaF-Lsg. (d)	0	0	0	0	0	+	0	0
0,5ccm s. P'tase-Lsg. 1:400 (g)	+	+	+	+	+	+	+	+
1 Std. bei 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+
15,0ccm Glykokoll-Puffer (k)	+	+	+	+	+	+	5ccm Glykokoll-P. (c)	
Ext.-Werte bez. auf 10ccm, sof., pH 10,9	0,040	0,040	0,090	0,070	0,040	0,010	1,950	2,050

Bei Vergleich der Ansätze 1 und 2 mit den DNS-Ansätzen 3,4 und 5 zeigt sich, daß bei letzteren höhere Extinktionswerte festzustellen sind; und zwar nehmen die Werte mit der DNS-Konzentration zu. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den früheren Versuchen mit der Form b der DNS. Unter der Annahme, daß die hochvisköse Form keine saure Phosphatase enthält (s.unten), würden die Werte für eine Aktivierung der sauren Phosphatase durch DNS sprechen. Trotz der üblichen Verdünnung des Enzyms (1:400) kann man nur eine geringe Aktivität des Fermentes bei pH 3,7 erkennen, während bei pH 5,4 und geringerer Ionenstärke der Pufferlösung die üblich hohe Aktivität - auch mit Colamin-Phenolphthalein-Phosphat - vorhanden ist.

Dieselben Versuche wurden mit einer anderen Verdünnung des Enzyms (Tab.9) wiederholt. Durch Ansatz 6, dem kein Ferment zugesetzt wurde, sollte ein Phosphatase-Gehalt der hochpolymeren DNS ausgeschlossen werden.

Tabelle 9

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
4,0ccm Substratlsg. (j) s.auch Text	+	+	+	+	+	+	+	Substr. lsg.(a)
0,5ccm a-DNS-Lsg.(1)	0	0	0,5	0,05	0,005	0,5	0	0
0,5ccm H ₂ O	+	+	0	0	0	+	0	+
0,5ccm NaF-Lsg.(d)	0	0	0	0	0	0	+	0
0,5ccm s.P'tase-Lsg. 1:200 (g)	+	+	+	+	+	0	+	+
1 Std. bei 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+
15,0 ccm Glykokoll- Puffer (k)	+	+	+	+	+	+	+	5ccm Gly- kokoll- Puffer(c)
Ext.-Werte bezogen auf 10 ccm, sofort, pH 10,9	0,090	0,092	0,146	0,126	0,100	0,006	0,016	über 2

Ansatz 6 läßt darauf schließen, daß die verwendete DNS keine aktive saure Phosphatase enthält, da der Extinktionswert sogar unter dem des Hemmwertes v.7 liegt. Die Extinktionen von 3,4 und 5 sprechen also für eine, wenn auch geringe A k t i v i e - r u n g des Fermentes, die mit der zugefügten DNS zunimmt.

Eine zweite Wiederholung (Tab.10) der Versuche mit einer höheren Enzym-Konzentration und bei einer verlängerten Inkubationszeit (2 Std.) bestätigt die vorherigen Ergebnisse. Die Extinktionen bei zwei Stunden Inkubationsdauer und 20 ccm kolorimetrierter Flüssigkeit würden ungefähr den Werten bei einstündiger Inkubation und 10 ccm kolorimetrierter Flüssigkeitsmenge entsprechen.

Tabelle 10

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
4,0ccm Substrat-lsg.(j)s.auch Text	+	+	+	+	+	+	Substrat-lsg. (a)	
0,5ccm a-DNS-Lsg.(1)	0	0	0,5	0,05	0,005	0	0	0
0,5ccm H ₂ O	+	+	0	0	0	0	+	+
0,5ccm NaF-Lsg.(d)	0	0	0	0	0	+	0	0
0,5ccm s.P'tase-Lsg.1:100 (g)	+	+	+	+	+	+	+	+
2 Std. bei 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+
15,0ccm Glykokoll-Puffer (k)	+	+	+	+	+	+	5ccm Glykokoll-P.(c)	
Ext.-Werte bezogen auf 10ccm, sofort, pH 10,9	0,230	0,250	0,421	0,365	0,342	0,017	weit über 2	

Aus den sechs Versuchsreihen geht hervor, daß unter den angegebenen Versuchsbedingungen die depolymerisierte b-DNS eine H e m m u n g der sauren Phosphatase im Sinne O H L M E I E R S bewirkt, die hochpolymere Form a jedoch eine A k t i v i e r u n g. Die Folgerungen sind naturgemäß nur dann zutreffend, wenn die Ansätze (s.Tab.8-10) keine die DNS denaturierende Substanz (Ferment oder Salz) enthielten, d.h.

wenn die hochpolymere Form in den jeweiligen Versuchen als solche bestehen bleibt, andernfalls würden sie sich widersprechen. Es ist also nicht anzunehmen, daß trotz der Elektrolytempfindlichkeit der a-Form der DNS letzteres in den Ansätzen depolymerisiert wird.

In tuberkulösen Käseherden kommt DNS frei im Gewebe vor (s. F e u l g e n - F ä r b u n g). Die DNS (Form b) hemmt in vitro die saure Phosphatase. Durch Zugabe einer Aufschwemmung von L u p u s g e w e b e bzw. v e r k ä s t e n L y m p h d r ü s e n in physiologischer Kochsalzlösung zu den Fermentansätzen sollte geprüft werden, ob die Aktivität der sauren bzw. alkalischen Phosphatase so direkt eine Hemmung erfährt (Tab.11).

V e r w a n d t e L ö s u n g e n :

s. Seite 10, 23; d,g,k und j.

Frisches, nasses Lupusgewebe bzw. verkäste Achsellymphdrüsen werden mit Quarzkörnchen p.a. zerrieben und mit physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Es resultierte eine trübe, gelbe Flüssigkeit.

Tabelle 11

Ansatz	1	2	3	4	5
4,0 ccm Substratlsg. (j)	+	+	+	+	+
0,5ccm Aufschwemmung v. tbc. Gewebe	0	0	Lup. Ly.-Dr.		0
0,5ccm H ₂ O	+	+	0	0	0
0,5ccm NaF-Lsg. (d)	0	0	0	0	+
0,5ccm s.P'tase-Lsg. 1:200 (g)	+	+	+	+	+
1 Std. bei 37°C	+	+	+	+	+
15,0ccm Glykokoll-Puffer (k)	+	+	+	+	+
Ext.-Werte bezogen auf 10 ccm, pH 10,9	1,112	1,092	weit über 2		0,044

Zwei ähnliche Versuchsserien wurden mit saurer Phosphatase bei einem pH von 5,4 und mit alkalischer Phosphatase bei pH 9,7 mit entsprechenden Ergebnissen durchgeführt. Die Extinktionswerte bei den jeweiligen Ansätzen mit tuberkulösem Gewebe, die vor dem Photometrieren geklärt wurden, lagen höher als die ohne irgendwelchen Zusatz. Wahrscheinlich sind die viel höheren Werte dadurch bedingt, daß sich zu der Wirkung der jeweils zugesetzten Phosphatase, die Aktivität der in den Lymphozyten vorhandenen Phosphatase addierte. Eine Hemmung durch die im käsigen tuberkulösen Material anwesenden Nukleinsäuren kann auf diese Weise nicht festgestellt werden.

Histochemische Versuche, phosphatasehemmende Strukturen im tuberkulösen Gewebe nachzuweisen.

Um phosphatasehemmende Strukturen im Gewebe nachzuweisen, muß zunächst eine Frage geklärt werden: Läßt sich die Wirksamkeit der sauren bzw. alkalischen Phosphatase, die als Lösung auf ein dünnes Gewebstückchen gebracht wird, im Gewebe färberisch darstellen?

Als zweites muß die geeignete Konzentration der Enzymlösung für die Gewebsschnitte ermittelt werden, denn der Hemmeffekt etwaiger Hemmkörper im Gewebe darf nicht durch eine zu starke Phosphatase-Aktivität überdeckt werden.

I n k u b a t i o n h i s t o l o g i s c h e r S c h n i t t e m i t a l k a l i s c h e r P h o s p h a t a s e.

In Petroläther entparaffinierte Hautgewebsschnitte (10 μ dick) wurden aus H_2O auf mit Eiweißgelatine vorbehandelte Objektträger aufgezogen und getrocknet. - Trotz Paraffineinbettung und langer Lagerung ließ sich in den histologischen Schnitten immer noch an Kapillarwänden und Haarfollikel alkalische Phosphatase nachweisen (8). Da es bei histochemischen Arbeiten unerläßlich ist, Kontrollversuche

mitzuführen, wurde nur bei einem Teil der Präparate die "natürliche Phosphatase" inaktiviert. Zu diesem Zweck wurde das jeweilige Präparat mit physiologischer NaCl-Lösung betropft, so daß es ganz von der Flüssigkeit eingehüllt wurde, und mindestens 10 Minuten UV-Licht ausgesetzt. So gelang es, die alkalische (auch etwaige Spuren saurer) Phosphatase vollkommen zu inaktivieren.

Von den zahlreichen in der Literatur angegebenen Methoden zum Nachweis von Monophosphoesterasen in histologischen Schnitten wurde die A z o f a r b - s t o f f - K u p p l u n g s - R e a k t i o n nach G R O G G und P E A R S E bei unseren Versuchen angewandt. Aus dem phenolischen Phosphorsäureester (α -N a p h t h y l - P h o s p h a t) wird durch die Phosphatase die phenolische Komponente freigesetzt, die, mit einem Amino-Salz gekuppelt, an der im Gewebe lokalisierten Phosphatase- und zwar nur dort - einen tiefgefärbten Diazofarbstoff erscheinen läßt.

V e r w a n d t e L ö s u n g e n :

- n) 1%ige alkalische Phosphatase aus Schweinenieren
- o) Substratpufferlösung:
 - 5 ccm ($1/7$ m Na-Azetat + $1/7$ m Veronal-Natrium)
 - +2 ccm 8,5%ige NaCl-Lösung
 - +0,25 ccm $1/10$ n HCl + 19,75ccm H_2O
 - +20 mg α -Naphthyl-Phosphat
 - +20 mg Echtblausalz RR auf pH 9,2 einstellen, filtrieren.
- e) Hemmlösung (Na_2HAsO_4)
Einzelheiten siehe P E A R S E 21)

Bevor die Präparate mit der Substratlösung betropft wurden, erfuhren sie jeweils eine verschiedene Vorbehandlung:

Tabelle 12

Präparat:	1	2	3	4	5	6
Inaktivierung der natürlich vorkommenden alk. Phosphatase durch UV-Licht	0	0	0	+	+	+
1%ige alk. Phosphatase wird in feiner Verteilung auf das trockene Präparat aufgesprüht	+	+	0	+	+	0
Besprühung mit H ₂ O	0	0	+	0	0	+
1 Tropfen Hemmlösung (e)	0	+	0	0	+	0
Trocknen der Präparate im Exsikkator bei Zimmertemperatur	+	+	+	+	+	+

Danach gemeinsame Weiterbehandlung der Präparate: Die histologischen Schnitte werden mit der Substratpufferlösung (o) vollständig bedeckt und 30 Minuten in einer feuchten Kammer belassen. Abspülen mit H₂O und Einbetten in Glyzeringelatine.

Bei mikroskopischer Betrachtung der Schnitte kann man folgendes feststellen: Im Präparat 1 sind die Kapillaren sehr zahlreich und intensiv schwarz gefärbt (p o s. D i a z o r e a k t i o n). Das übrige Gewebe weist keinerlei Phosphataseaktivität auf. Der Schnitt ist nur diffus braun bis dunkelbraun gefärbt. Präparat 2 zeigt, wie auch Präparat 5 und 6 keine Schwarzfärbung. Im Gewebe des Präparates 4 läßt sich ebenfalls keine pos. Diazoreaktion feststellen. Dagegen ist in der überstehenden Substratlösung nach der halbstündigen Inkubation deutlich eine schwarze, krümelige Ausfällung erkennbar, die sich bei genauer Betrachtung als pos. Phosphatasereaktion erweist. Derselbe Befund ist auch bei Präparat 1 noch zusätzlich zu erheben.

Eine pos. Diazoreaktion ist schwach in den Kapillarwänden des Präparates 3 festzustellen. Es sind aber nicht nur weniger Kapillaren sichtbar wie bei 1, sondern sie sind auch nicht so intensiv gefärbt; beide Präparate stammen aus derselben Schnittserie.

Die Befunde sind nur dahingehend zu deuten, daß eine Verstärkung der in den Kapillaren noch vorhandenen Enzymspuren durch Bebrütung mit exogener Phosphatase-lösung eintritt. Außerdem besaß das exogene Ferment,

wie zu erwarten, eine beträchtliche Aktivität: Ausfall des schwarzen Diazofarbstoffes in der überstehenden Substratlösung. Die Nichterzielung einer diffusen Phosphatasefärbung im Hautgewebe überrascht; sie kann vielleicht dadurch erklärt werden, daß das Gewebe nicht die Fähigkeit besitzt, den Farbstoff zu fixieren, außer an den Stellen, wo natürlicherweise schon das Enzym vorkommt (Kapillaren, Haarfollikel). Es ist auch möglich, wenn auch unwahrscheinlich, daß der Diazofarbstoff an den in der Fermentlösung reichlich vorhandenen Eiweißkörpern fixiert wird (Affinität).

Die nachstehend angegebenen Variationen der Arbeitsmethode haben entweder eine Auflockerung des Gewebes zum Ziel oder das Ferment soll näher an das Gewebe herangebracht werden; d.h. die Phosphatase soll durch Mittel, die ihre Aktivität nicht beeinträchtigen, im Gewebe ausgefällt werden. Auch wurde daran gedacht, daß die Paraffinfixierung das Gewebe in dem Sinne verändert haben könnte, daß die Fähigkeit zur Fixation des Farbstoffes verloren gegangen ist.

- a) Zunächst die Versuche, durch die eine Veränderung der Gewebsstruktur erreicht werden sollte. Fünf Präparate wurden wie oben (Tab.12) z.Z. durch UV-Licht inaktiviert und mit 1n (und 1/10n) NaOH betropft. — **Quellung des Gewebes.** — Abtrocknen mit Fließpapier, danach aufbewahren in Substratlösung (o) für 5 Min.. Trocknen. Weiterbehandlung mit Fermentlösung (n), Hemmlösung usw.. In einer weiteren Versuchsserie wurden die Schnitte mit 0,2%iger NH_3 -Lösung vorbehandelt.
- b) Zur **Fixierung** der alkalischen Phosphatase wurden weiter je 5 Präparate mit dem Enzym versetzt, das im Azeton- bzw. Alkoholbad (60%ig) gefällt wird. Dann erst werden Hemmstoff, Substratlösung usw. zugegeben.
- c) Bei anderen Präparaten wieder sollte durch "Baden" in der Fermentlösung eine gute **Durchtränkung** des Gewebes mit dem Enzym erreicht werden.

- d) Von dem Gedanken ausgehend, daß durch die Paraffineinbettung das Gewebe die Fähigkeit zur Fixation des Diazofarbstoffes verloren haben könnte, wurde auch einmal frisches Hautgewebe unfixiert geschnitten (CO_2 -Schnee) und die entsprechenden Versuche durchgeführt.
- e) Weiter wurden formolfixierte Schnitte verwendet.

Trotz der verschiedenen Vorbehandlung der Präparate konnten immer nur dieselben Resultate wie beim ersten Versuch erzielt werden. Um Zufallsergebnisse auszuschließen, wurden die einzelnen Versuche mehrmals wiederholt. Zusammenfassend kann man sagen, daß es nicht gelang, durch das zugesetzte Ferment eine diffuse, positive Diazoreaktion im Gewebe zu erreichen.

Auffallend ist nur, daß immer bei den nicht inaktivierten Präparaten nach Enzymzusatz die Stellen, die natürlicherweise schon eine alkalische Phosphatase-reaktion zeigen (Kapillaren, Haarfollikel), intensiver und deutlicher schwarz gefärbt sind als bei den Schnitten ohne Fermentzusatz. Man hat den Eindruck, als ob eine Auffrischung der phosphatasehaltigen Gebiete im Gewebe stattgefunden hätte. War aber einmal die Phosphatase durch UV-Licht oder durch Erhitzen der Präparate auf 100°C (trockene Hitze) für 30 Min. oder auf 78°C für 18 Stunden vollständig inaktiviert, so ist an den Kapillarwänden und Haarfollikeln nach exogenem Phosphatasezusatz keine Aktivität des Fermentes mehr feststellbar.

Bei Wahl einer anderen Methode (Bleiphosphatmethode nach (Gomori 8) konnte man auch nicht die erwünschten Resultate erhalten.

Auf Grund des negativen Ausfalls der Versuche einer Imbibition histologischer Schnitte mit alkalischer Phosphatase waren den Versuchen zum Nachweis hemmender Substanzen in bestimmten Strukturen naturgemäß die Voraussetzungen entzogen.

I n k u b a t i o n h i s t o l o g i s c h e r S c h n i t t e m i t s a u r e r P h o s p h a t a s e

V e r w a n d t e L ö s u n g e n :

s. Seite 9, 23; d, g (1:100)

p) Substratpufferlösung:

5 ccm ($1/7m$ Na-Azetat + $1/7m$ Veronal-Natrium)

+ 2 ccm 8,5%ige NaCl-Lösung

+ 7,5 ccm $1/10n$ NaCl + 10,5 ccm H_2O

+ 20 mg α -Naphthyl-Phosphat

+ 25 mg Echtblausalz B, auf pH 5

einstellen. Filtrieren. (Zitronensäure

aktiviert saure Phosphatase: deshalb

0,5 ccm Zitratpuffer von pH 5 zu jeweils

25 ccm Substratlösung)

Fünf Schnitte vom gleichen Hautpräparat wurden entparaffiniert und entsprechend wie bei den Versuchen im vorherigen Abschnitt mit saurer Phosphatase behandelt. Die Präparate wurden in ein "Substratpufferbad" gegeben - wie z.T. bereits bei Inkubation mit alkalischer Phosphatase, -, anstatt sie nur mit Substratlösung zu betropfen (größere Pufferkapazität!).

Im histologischen Schnitt ließ sich als Ausdruck der sauren Phosphatase-Aktivität der z i e g e l - r o t e D i a z o f a r b s t o f f fixieren. Das Gewebe konnte diffus und intensiv rot angefärbt werden. Doch war die Epidermis, die normalerweise saure Phosphatase enthält, intensiver gefärbt als die Cutis - auch nach UV-Bestrahlung. -. Man kann daher ein orthotropes Verhalten entweder des exogen angebotenen Fermentes oder des Diazofarbstoffes feststellen.

Zur Nachweisbarkeit etwaiger im tuberkulösen Gewebe (Lupus vulgaris) vorhandener Hemmkörper für die saure Phosphatase wurde die zugesetzte Fermentlösung soweit verdünnt, daß die Diazofärbung gerade noch zu erkennen war. Bei den einzelnen Präparaten konnte nur eine zarte, diffuse Rötung festgestellt werden oder in anderen Fällen gar keine Färbung,

wenn der Verdünnungsgrad zu hoch gewählt worden war.

Lokale Aufhellungen, d.h. Fehlen des Diazofarbstoffes als Ausdruck einer Enzymhemmung, konnte bei keinem Präparat festgestellt werden. - Nur das erwähnte orthotrope Verhalten des Farbstoffes fiel auf. - In tuberkulösen Strukturen verankerte Hemmsubstanzen für die saure Phosphatase waren demnach unter diesen Versuchsbedingungen nicht nachweisbar.

Zur Hemmbarkeit der sauren Phosphomonoesterase durch Beryllium-Ionen

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase kann durch sehr kleine Mengen von B e - I o n e n gehemmt werden (14;25). - H E L F E R I C H und S T E T T E R (10) sind der Meinung, daß die Hemmwirkung von Be-Salzen unter Umständen durch begleitende Fluoride bedingt ist.- Bei der sauren Phosphatase kann man den gleichen Effekt erst bei einer höheren Be-Konzentration erreichen. Mangan konnte die Hemmwirkung bei der alkalischen Phosphatase verhindern.

D U B O I S (5;25) hält es für wahrscheinlich, daß die Hemmbarkeit der alkalischen Phosphatase durch Beryllium davon herrührt, daß Be, Mg und Ca um dieselbe Molekülgruppen am Ferment wetteifern. Es würde demnach eine k o m p e t i t i v e H e m m u n g sein. Da gerade die alkalische Phosphatase, die durch Mg aktiviert wird, prozentual etwas mehr durch Be gehemmt wird als die saure, nimmt man an, daß Beryllium eine größere Affinität zum Enzym besitzt als Magnesium. Die Hemmwirkung von Be scheint spezifisch zu sein (14), da Be-Konzentrationen noch unter $1:10^{-6}$ einen deutlichen Hemmeffekt auf die alkalische Phosphatase bewirken; im Gegensatz zu anderen Fermenten.

Be-Verbindungen und Tuberkelbazillen rufen dieselben Strukturveränderungen im Gewebe hervor, die histologisch kaum voneinander getrennt werden können. R O T H M A N (25) nimmt arbeitshypothetisch an, daß bestimmte Stoffwechselprodukte des Tuberkelbazillus ähnlich dem

Beryllium einem bestimmten Reaktionsmechanismus auslösen, der dann zur Bildung der spezifischen Knötchen führt. Der Autor dachte dabei an eine gemeinsame Hemmung der Phosphatasen.

R O U L E T (27) andererseits denkt arbeitshypothetisch an drei Möglichkeiten der Epitheloidzellgenese:

- 1.) Bazilläre Phosphatide bedingen direkt eine Epitheloidzellbildung.
- 2.) Immun- und Antikörper histogener Natur gegen Bakterien enthalten Phosphatide und bedingen Gewebsreaktionen gemäß 1.
- 3.) Fremdkörper (SiO_2 , Be) regen Fremdkörperreaktion an mit Entstehung von Zellen, die Immunisation bedingende Phosphatide bereitstellen.

Unter bestimmten Bedingungen kann, wie auch in dieser Arbeit gezeigt wurde, DNS (Form b) in vitro die saure Phosphatase hemmen. Die Hemmbarkeit der sauren Phosphatase durch Be-Ionen soll im folgenden nachgeprüft werden.

Das gut wasserlösliche BeCl_2 wurde aus BeO dargestellt. Eine Verunreinigung mit störenden Substanzen (Fluoride!) ist somit sehr unwahrscheinlich. BeCl_2 kam in den Versuchsansätzen (6 ccm) in der Konzentration von 0,1, 0,01 molar usw. zur Wirkung(m). Weitere Lösungen s. Seite 9, 23; a (Colamin-Ph.-Phosphat), c, d, g.

Tabelle 13

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
4,5ccm Substratlsg. (a)	+	+	+	+	+	+	+	+
1,0ccm BeCl_2 -Lsg. (m)	0	0	0,00001	0,0001	0,001	0,01	0,1	0
1,0ccm H_2O	+	+	0	0	0	0	0	0
1,0ccm NaF-Lsg. (d)	0	0	0	0	0	0	0	+
0,5ccm s.P'tase-Lsg. 1:400 (g)	+	+	+	+	+	+	+	+
1 Std. bei 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+
4,0cc, Glykokoll-P. (c)	+	+	+	+	+	+	+	+
Ext.-Werte sofort (10 ccm)	1,195	1,105	1,850	0,850	0,740	0,540	0,030	0,030

Bei den Ansätzen 6 und 7 entsteht eine Fällung, die sich nach Zugabe von Glykokollpuffer wieder auflöst; also bei der Photometrie nicht stört. Bei näherer Betrachtung zeigte es sich, daß Colamin-Phenolphthalein-Phosphat durch BeCl_2 ausgefällt wurde; d.h. das Substrat wurde dem Ferment entzogen. Ob daneben noch eine Hemmwirkung auf die saure Phosphatase besteht, läßt sich mit der gewählten Versuchsanordnung demnach nicht feststellen.

Im Gegensatz dazu steht das Ergebnis des Ansatzes 3. Der Extinktionswert, der hier viel höher liegt als die Vergleichswerte ohne Be-Zusatz (Ans. 1, 2) läßt eine Aktivierung des Enzyms durch Be in sehr geringer Konzentration ($0,00001 \text{ m}$) vermuten. Dieser Befund wurde durch verschiedene Kontrollversuche bestätigt.

D Über die saure Phosphatase des Stratum corneum

Die Anwesenheit von saurer Phosphatase in wässrigen Auszügen der peripheren Hornschicht von Hautgesunden wurde schon früher wahrscheinlich gemacht (29;30). Nach der Methode von G R O G G und P E A R S E konnte die saure Phosphatase eindeutig histochemisch festgestellt werden. Das Maximum der Fermentaktivität soll demnach in der Zone des Stratum keratohyal'nicum liegen; aber auch im Stratum corneum ist saure Phosphatase nachweisbar.

Zur Untersuchung der Enzymaktivität wurde zunächst durch Abschaben der Hautoberfläche von Rückenpartien gesunder bzw. kranker Versuchspersonen epidermales Material gewonnen und daraus ein wässriger Auszug hergestellt, der als Fermentlösung diente.

M e t h o d e :

Das Hautgeschabsel wird mit sterilem Quarzsand zu Pulver zerrieben und mit einer bestimmten Menge von Na-Azetatpuffer (pH 5,4) unter ständigem Umrühren bei 0°C 5 Stunden stehengelassen. Abtrennen des Eluats durch Filtrieren. Eine möglichst vollkommene Eluierung sollte durch eine abermalige Zugabe von Puffer unter denselben Bedingungen wie oben erreicht werden. Filtrieren. Die beiden Filtrate werden zusammengegeben und bis zur Aktivitätsbestimmung im Eisschrank (4°C) aufbewahrt. Der Fermentgehalt wurde nach der Methode von H U G - G I N S und T A L A L A Y (12) bestimmt.

U n t e r s u c h u n g v o n n o r m a l e n
H a u t s c h u p p e n a u f i h r e n
G e h a l t a n s a u r e r P h o s p h a t a s e
135,85 mg Schuppen werden mit insgesamt 6ccm Na-Azetatpuffer versetzt. Erhaltene Eluatmenge ca. 5,5 ccm.

Tabelle 14

Ansatz	1	2	3	4
4,5 ccm Substratlsg. (a)	+	+	+	+
1,0 ccm Aqua dest.	+	+	+	0
1,0 ccm NaF-Lsg. (d)	0	0	0	+
0,5 ccm Eluat	+	+	+	+
1 Std. bei 37°C	+	+	+	+
4,0 ccm Glykokoll-P. (c)	+	+	+	+
Ext.-Werte sofort, pH 10,8	0,255	0,267	0,270	0,033

Vom Durchschnittswert der ersten drei Extinktionen wird der Hemmwert 4 abgezogen: 0,231. Dieser Wert entspricht dem eigentlichen durch die saure Phosphatase vom Phenolphthalein-Phosphat freigesetzten Phenolphthalein. Der Wert 0,231 entspricht 51,5 H.E. pro 100 ccm Fermentlösung. Die in 100 mg Schuppenmaterial enthaltene saure Phosphatase weist eine Aktivität von 2,083 H.E. auf, wenn man annimmt, daß das Enzym vollkommen in das Eluat übergang (siehe auch Abschnitt B).

Die Fehlerbreite der Aktivitätsbestimmung wird dadurch erhöht, daß der Filtrationsrückstand (Schuppen) noch einen gewissen Anteil des Ferments zurückbehält. Durch zweimaliges Eluieren wurde diese Ungenauigkeit auf ein Minimum reduziert, so daß wir sie praktisch vernachlässigen konnten.

U n t e r s u c h u n g v o n P s o r i a s i s - s c h u p p e n a u f i h r e n G e h a l t a n s a u r e r P h o s p h a t a s e

Im folgenden haben wir uns darauf beschränkt, nur die von der oben beschriebenen Aktivitätsbestimmung **abweichenden** Werte und die resultierenden H.E. pro 100 mg trockenen Schuppenmaterials anzugeben.

Eluat I

400 mg Psoriasisschuppen mit insgesamt 30 ccm Na-Azetatpuffer versetzt: 47,46 H.E./100 mg Schuppen.

Eluat II

300 mg Psoriasisschuppen mit insgesamt 22,5 ccm
Na-Azetatpuffer versetzt: 22,4 H.E./100 mg Schuppen.

Eluat III

153,6 mg Psoriasisschuppen mit insgesamt 12 ccm
Na-Azetatpuffer versetzt: 24,68 H.E./100 mg Schuppen.

Eluat IV

15,6 mg Psoriasisschuppen mit insgesamt 2 ccm
Na-Azetatpuffer versetzt: 23,45 H.E./100 mg Schuppen.

Eluat V

82 mg Psoriasisschuppen mit insgesamt 7 ccm Na-Aze-
tatpuffer versetzt: 60,9 H.E./100 mg Schuppen.

Eluat VI

160 mg Psoriasisschuppen mit insgesamt 16 ccm
Na-Azetatpuffer versetzt: 41,7 H.E./100 mg Schuppen.

U n t e r s u c h u n g v o n
e r y t h r o - k r u s t ö s - s q u a m ö s e n
E k z e m s c h u p p e n a u f i h r e n
G e h a l t a n s a u r e r P h o s p h a t a s e

500 mg Schuppen mit insgesamt 15 ccm Na-Azetat-
puffer versetzt: 16,49 H.E./100 mg Schuppen.

Die Feststellung der erwähnten Autoren über das Vorkommen von saurer Phosphatase im Stratum corneum, vor allem im Stratum disjunctum der Haut konnte bestätigt werden. Weiterhin konnte bei Psoriatikern in wässrigen Auszügen aus Hautschuppen (erkrankte Stellen) ungefähr die 17-fache Aktivität des genannten Ferments wie in gesunden Hautschuppen nachgewiesen werden.

Bei erythro-krustös-squamösen Ekzemschuppen lagen die Werte bei einem untersuchten Fall nicht so hoch: nur die 8-fache Phosphatase-Aktivität wie bei Hautgesunden Patienten.

Die bei Psoriasisschuppen erhaltenen Werte in H.E., bezogen auf 100 mg trockenes Epidermismaterial, differieren z.T. sehr erheblich. Das mag daran liegen, daß erstens die einzelnen Patienten eine ver-

schiedene innere, nicht lokale Vorbehandlung erfahren hatten, zweitens das Verhältnis Schuppenmenge zu Na-Azetatpuffer und drittens wohl auch das Verhältnis parakeratotische Schuppen zu krustösem Exsudat im Effloreszenzenmaterial nicht immer gleich war.

E Zur Nachweisbarkeit einer Nukleinase

(DNS-Depolymerase)

im Normalschuppeneluat, Psoriasisschuppeneluat

und im Prostataphosphatasepräparat

Das Ferment "N u k l e i n a s e" depolymerisiert die säurefällbare DNS (Form b) in ein dialysierbares, nicht säurefällbares Mononukleotid. Diese Depolymerase hält man für eine Diesterase; sie vermag also Diphosphorsäureester zu hydrolysieren.

Die adulte menschliche Prostata soll nach M O O R E und H A N Z E L (19) Nukleinaseaktivität aufweisen. Nach R E I S (22) wird sie auf eine 5-Nukleotidase zurückgeführt, die sowohl im alkalischen als auch im sauren Reaktionsgebiet wirksam ist.

Der indirekte Nachweis einer Nukleinase stützt sich auf die Tatsache, daß die Depolymerase mit ihrem Substrat (DNS, Form b) bei optimalen Bedingungen zusammengebracht, die beiden Estergruppen der Phosphorsäure verseift, falls Monophosphoesterasen anwesend sind. Andernfalls kann naturgemäß keine freie Phosphorsäure abgespalten werden. Es wird Phosphorsäure frei, die entweder selbst bestimmt wird, oder die durch sie hervorgerufene Ansäuerung der Ansatzlösungen wird gemessen. Die Phosphorsäurebestimmung wurde nach der Vorschrift von L O H M A N N und J E N D R A S S I K (11) durchgeführt. (Einzelheiten siehe dort).

V e r w a n d t e L ö s u n g e n :

- g) siehe Seite 23
- h) (DNS-Lösung, Form b in mg/Ansatz),
- q) Na-Azetatpuffer pH 5,4 (1/10n Essigsäure, Na-Azetat)
- r) Psoriasisschuppeneluat II, unverdünnt (s. Abschnitt D)
- s) Normalschuppeneluat (s. Abschnitt D)
- t) 5%iges Ammoniummolybdat in 5n H_2SO_4
- u) Anstatt Eikonogen wurde Amidollösung (2,4-Di-Amidophenolchlorhydrat) verwendet.

Tabelle 15

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7
1,0ccm Ps.-Eluat(r)	+	+	+	+	1,0ccm H ₂ O	+	+
2,0ccm DNS-Lsg.(h)2mg	+	+	+	2,0ccm H ₂ O	+	+	+
6,5ccm Pufferlsg.(q)	+	+	6,5ccm H ₂ O	+	+	+	+
1 Std. bei 37°C	+	+	+	+	+	0	0
2,5ccm Amm-Molybdat(t)	+	+	+	+	+	+	+
Weißer Niederschlag	+	+	+	+	+	+	+
Lsgen.durch Zentrifugieren geklärt							
0,5ccm Amidollsg.(u)	+	+	+	+	+	+	0
7 Min. b.37°C u. darauf	7 Min. b.	7 Min. b.	7 Min. b.	Zimmertemp.	i.	Wasserbd.	
Ext.-Werte sofort	0,130	0,125	0,108	0,090	0,093	0,130	0,035

Photometrie: Eppendorf-Photometer "Medeor", Filter Hg 691 m μ ,
 Photozelle 90 r, 2 cm Küvette, kolorimetrierte Flüssigkeitsmenge 12,5ccm (auch bei (Tab. 16,17)).

Die Ansätze 1,2 und 6 (unbebrütet) weisen denselben Phosphatgehalt auf, geben gleiche Extinktionswerte (Tab.15). Auch die Summe der beiden Werte von 4 und 5 ergibt nach Abzug des doppelten Blindwertes v.7 ungefähr die Werte von 1,2 und 6. Die Ergebnisse ergeben keinen Anhaltspunkt für die Existenz einer Nukleinasen im Psoriasisschuppeneluat.

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1,0ccm s.P'taselslg.(g)	1/100 1/200 1/400 1/200 H ₂ O 1/200						+	+	H ₂ O	+	H ₂ O	+
1,0ccm Ps.-Eluat (r)							+	+	H ₂ O	+	H ₂ O	
2,0ccm DNS-Lsg. 2mg (h)	+	+	+	+	+	H ₂ O	+	+	H ₂ O	+	H ₂ O	
6,5ccm Pufferlsq.(q)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 Std. bei 37°C	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0
2,5ccm Amm-Molybdat(t)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Weißer Niederschlag	++	++	++	++	+	0	++	++	+	+	+	+

Tabelle 16

Die 12 ccm Ansatzlösung werden nach gutem Umschütteln geteilt. 6 ccm werden mit 0,25 ccm Amidolsq. versetzt und im Wasserbad 7 Min. bei 37°C und weitere 7 Min. bei Zimmertemperatur belassen; umschütteln und dann Bestimmung der Ext.-Werte(A). Die restlichen 6 ccm werden mit 0,25 ccm H₂O versetzt, umschütteln, photometrieren(B). Die Differenz der Werte von A und B ergeben dann die eigentlichen Ext.-Werte ohne Niederschlag (C).

A Ext.-Werte	1,230	0,850	0,700	0,570	0,380	0,120	1,120	1,100	0,380	0,600	0,330	0,580
B Ext.-Werte o. Amidolsq.	0,200	0,120	0,105	0,137	0,100	0,025	0,390	0,380	0,113	0,120	0,116	0,110
C Differenz v. A und B	1,030	0,730	0,595	0,433	0,280	0,095	0,730	0,720	0,267	0,480	0,214	0,470

Der störende Einfluß des Niederschlages auf die Photo-
metrie, der sich nach Zugabe der stark sauren Ammo-
nium-Molybdatlösung zur DNS und Fermentlösung ergibt,
wurde dadurch ausgeschaltet, daß nur die Hälfte der
jeweiligen Ansatzlösungen mit Amidollösung versetzt
wurde (Tab.16). Der andere Teil ohne Amidolzusatz zeig-
te die Blaufärbung nicht. Die Differenz der beiden be-
stimmten Extinktionen ergibt einen Wert, der dem Phos-
phatgehalt des jeweiligen Ansatzes entspricht. Auch die
unter diesen Versuchsbedingungen gefundenen Werte las-
sen nicht auf eine Nukleinase im Psoriasisschuppeneluat
schließen. Man vergleiche 7 mit 8. - Die DNS-Lösung
und das Eluat weisen einen erheblichen anorganischen
Phosphatgehalt auf.-

Von einer Phosphatabspaltung von DNS durch die
Prostata-Phosphatase könnte man hingegen sprechen,
da die Extinktionswerte der Ansätze mit einstündiger
Bebrütung(Ans.2)und ohne Bebrütung(Ans!4)differieren(0,297).
Ansatz 1 und 3 mit verschiedener Enzymkonzentration
(Tab.16). Die DNS-Lösung selbst enthält anorganisches
Phosphat (Ans.5).

Tabelle 17

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1,0ccm s.P'taselsg.(g)	+	+	+	H ₂ O	+								
1,0ccm Ps.-Eluat (r)						+	+	+	H ₂ O	+			
1,0ccm N.-Eluat (s)											+	+	+
2,0ccm DNS-Lsg.													
0,2mg (h)	+	+	+	+	H ₂ O	+	+	+	+	H ₂ O	+	+	+
6,5ccm Pufferlsg.(q) -	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 Std. bei 37°C	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+
2,5ccm Amm.-Molybdat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(t)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,5ccm Amidollsg.(u)	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+
7 Min. bei 37°C und weitere 7 Min. bei Zimmertemperatur.													
Ext.-Werte sofort	0,100	0,100	0,085	0,060	0,035	0,120	0,125	0,043	0,030	0,065	0,210	0,160	0,220

Zur Ausschaltung des störenden Einflusses der Fällung auf die photometrische Extinktionsbestimmung wurde noch ein anderer Weg beschritten (Tab.17). Es zeigte sich nämlich in Vorversuchen, daß DNS in der Konzentration von 0,2 mg pro 12 ccm Ausatzlösung im sauren Milieu nicht ausfällt. Auch nach Zugabe v. (1:200) saurer Phosphatase (Prostata) oder Normalschuppen-eluat tritt keine Trübung auf. Eine solche macht sich nur dann bemerkbar, wenn DNS und Psoriasis-schuppen-Eluat im Ansatz zusammenkommen. Diese Trübung wiederum versuchten wir dadurch auszuschalten, daß die zu kolorimetrierende Flüssigkeit (im Ansatz 6 und 7 trat nur eine Trübung auf) nicht gegen Wasser, wie bei den anderen Versuchen, sondern gegen den Ansatz 8 ohne Amidollösung photometriert wurde.

Durch die Versuche 6-10 konnten die früheren Ergebnisse bestätigt werden (s.Tab.15 und 16). Es ergab sich wieder kein Anhaltspunkt für eine aus der DNS phosphatabspaltende Diesterase; man vergleiche Ansatz 6 mit 7.

Bei Verwendung von Phosphataselösung (Prostata) als "Fermentlösung" zeigte sich in keinem der Ansätze eine Trübung. Es wurde daher auch gegen Wasser kolorimetriert. Der bebrütete Ansatz hatte eine Extinktion von 0,100, der unbebrütete von 0,085. Der Unterschied der beiden Werte ist zu gering bzw. liegt im Bereich der Fehlerbreite der Methode, sodaß man aus ihm nicht auf das Vorhandensein einer Nukleinase im Prostata-Phosphatasepräparat schließen kann. Das steht aber im Gegensatz zu den Ergebnissen der Tabelle 16.

Normalschuppen-Eluat vermag augenscheinlich unter den angegebenen Versuchsbedingungen von DNS (Form b) Phosphat abzuspalten, da doch die Extinktionswerte von 11 und 13 etwas höher liegen als beim unbebrüteten Ansatz 12. Die niedrigen Extinktionen der Tabelle 17 (vgl.Tab.16) rühren davon her, daß die DNS, die einen erheblichen Teil anorganischen Phosphats frei enthält, in einer geringeren Konzentration verwendet wurde.

In der Annahme, daß das von der Nukleïnase freigesetzte Phosphat den pH-Wert der Ansatzlösungen zur sauren Seite hin verschiebt, wurden folgende Versuche ausgeführt.

Tabelle 18

Ansatz	1	2	3	4	5
2,0ccm DNS-Lsg. 2mg(h)	+	+	+	+	+
1,0ccm Ps.-Eluat (r)	H ₂ O	+	+		
1,0ccm s.P'taselsg. 1:200 (g)				+	+
1,0ccm NaF-Lsg.(d)	H ₂ O	H ₂ O	+	H ₂ O	+
pH der Ansätze sofort	4,72	5,30	5,65	4,82	5,67
pH auf ca.6,0 eingest.	6,00	6,02	6,00	6,05	6,00
pH nach Bebrütung b.37°C					
nach 1 Std.	6,02	6,02	6,02	6,05	6,00
nach 3 Stunden	6,12	6,12	6,10	6,10	6,10
nach 6 Stunden	6,10	6,10	6,08	6,06	6,05

DNS-Lösung in der Konzentration von 1mg/ccm H₂O als Substratlösung mit Psoriasissschuppen-Eluat bzw. PhosphataseLösung aus Prostata zusammengebracht, werden mit Hilfe des pH-Ionostaten durch tropfenweise Zugabe von 1/10n NaOH auf ein pH von ca. 6 gebracht. NaF dient als Hemmsubstanz für die Phosphomonoesterase. Die Ansätze werden im Thermostaten bei 37°C belassen und der pH-Wert nach 1,3 und 6 Stunden Bebrütungszeit überprüft.

Keiner der Ansätze zeigte eine Erhöhung der H-Ionenkonzentration. Sie blieb praktisch konstant. Man kann also auch durch diesen Versuch nicht auf eine etwaige im Psoriasissschuppen-Eluat bzw. Prostata-Phosphatasepräparat vorhandene Nukleïnase schließen. Eine Zunahme der H-Ionen hätte sich in den Ansätzen bemerkbar machen müssen, da bewußt auf einen Pufferzusatz verzichtet wurde. Die Pufferkapazität der DNS und der Fermentlösungen dürfte wohl kaum ins Gewicht fallen.

III. Zusammenfassung

- I. Kurze Charakterisierung der Phosphatasen.
- II. Eigene Untersuchungen:

A Nach Darstellung und Reinigung der alkalischen Phosphatase aus Schweinenieren und der sauren aus menschlichen Prostata-Drüsen wurde B die Aktivität der beiden Fermentextrakte, die für die folgenden Untersuchungen erforderlich waren, nach der Methode von H U G G I N S und T A L A L A Y ermittelt.

Im Abschnitt C wurde das Problem der histo-chemischen Nachweisbarkeit spezifischer Hemmstoffe für die saure bzw. alkalische Phosphomonoesterase im tuberkulösen Hautgewebe (Lupus vulgaris) von verschiedenen Seiten aus angegangen.

Zunächst wurde eine Übersicht unserer Kenntnisse über das histo-chemische Verhalten der Phosphomonoesterasen in tuberkulösen Strukturen gegeben. Die alkalische Phosphatase soll nur in der Umgebung des Tuberkels in Fibroblasten und Kapillaren vorkommen, die saure dagegen auch innerhalb von verkästen Herden. Bei den von Natur aus tuberkulose-resistenten Tierarten (Ratte, Maus) soll in den mononukleären Phagozyten reichlich saure Phosphatase lokalisiert sein, die die tuberkulogenen Phosphatide der Bakterienleiber zu zerstören in der Lage sind. Die geringe Aktivität oder das Fehlen des gleichen Enzyms bei den anfälligen Tieren (Meerschweinchen, Kaninchen) soll darauf schließen lassen, daß der Abbau des Tuberkelbazillus langsamer vor sich geht bzw. überhaupt nicht möglich ist.

Aber nicht nur ein Fehlen des erwähnten Fermentes könnte diese Tuberkelbazillenanfälligkeit zur Folge haben, sondern ebenso eine Hemmung des Enzyms durch bestimmte chemische Substanzen, wie z.B. DNS.

Es wurde zur Durchführung entsprechender Untersuchungen

- 1.) hochpolymere a-DNS nach S C H W A N D E R und S I G N E R hergestellt.
- 2.) In tuberkulösen Geweben, vor allem in verkästen Herden wurde der DNS-Nachweis außerhalb von Zellstrukturen (Feulgen) mit positivem Ergebnis durchgeführt.
- 3.) In in-vitro-Versuchen konnte die von O H L M E Y E R angegebene Hemmung der pH 3,7-Phosphatase durch die niedermolekulare b-DNS bestätigt werden. Bei der hochpolymeren a-DNS wurde dagegen eher eine leichte Aktivierung desselben Fermentes unter den angegebenen Versuchsbedingungen gefunden.
- 4.) Ein histo-chemischer Nachweis phosphatasehemmender Strukturen im tuberkulösen Gewebe konnte trotz vielfältiger Abwandlung der Versuchsbedingungen weder für die saure noch für die alkalische Phosphatase erbracht werden.
- 5.) Im weiteren wurde die Wirkung von Beryllium-Ionen auf die saure Phosphatase untersucht, da Beryllium-Verbindungen und Tuberkelbazillen histologisch schwer zu unterscheidende pathogene Strukturveränderungen im Gewebe hervorrufen. Die tiefere Wurzel dieser fast identischer, pathogener wie histogener Ätiologie könnte arbeitshypothetisch in einer Hemmung der sauren Phosphatase durch Substanzen der Tuberkelbazillen bzw. durch Beryllium mit R O T H - M A N vermutet werden. Die eigenen Untersuchungen mußten die Beantwortung der Frage über diese Beryllium-Wirkung offen lassen, da die Ergebnisse der in-vitro-Versuche nicht eindeutig waren.

Im Abschnitt D wird über das näher geprüfte Vorkommen der sauren Phosphatase im Stratum corneum berichtet. Es ergibt sich eine Erhöhung der Fermentaktivität in den Hautschuppen von Psoriatikern (17-fach) und Ekzemkranken (kr.-squ.Ekzem, 8-fach) im Vergleich zu hautgesunden Personen.

E Eine DNS-Depolymerase ließ sich im Psoriasis-schuppeneluat nicht nachweisen. Beim Normalschuppeneluat sprechen die Ergebnisse für das Vorkommen dieses Fermentes in der peripheren Hornschicht, während die Versuche bei dem Prostataphosphatasepräparat nicht eindeutig ausfielen.

Für die Überlassung des Themas und der freundlichen Mithilfe bei der Durchführung der Versuche möchte ich Herrn Privatdozenten Dr.W. S p i e r meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Dem Direktor der Dermatologischen Universitätsklinik, Herrn Prof. Dr.A. M a r c h i o n i n i danke ich recht herzlich für die Übernahme des Korreferates und die Erlaubnis zur Benutzung der Apparate des Institutes.

IV. Bibliographie

1. Abul-Fadl, M.A.M., J.King u.a.: Biochem.
J. 44, 4, 428
2. Albers, H., E.Beyer, A.Bohnenkamp und G.Müller:
Ber.dtsch.chem.Ges. 71, 913 (1938)
3. Bamann, E. und K.Myrbäck: Methoden der Ferment-
forschung, II, 1635 (1941)
4. Courtois, J. und C.Anagnostopoulos: C.r.Acad.Sci.
226, 523 (1948)
5. Du Bois, K.P.: Science 110, 420 (1949)
6. Gerstl, P. und R.Tennant: Amer.Rev.Tbc. 46, 600
(1942)
7. Cössner, W.: Handb.d.Allg.Path.: Entz.und Imm.
7, I, 356 (1956)
8. Gomori, G.: Zitat nach Pearse (s.21)
9. Grogg, E. und A.G.E.Pearse: Brit.J.Exper.Path.
33, 567 (1952)
10. Helferich, B. und H.Stetter: Ann.Chem. 560, 191
(1948)
11. Hinsberg und Lang: Med.Chemie 1938
12. Huggins, C. und P.Talalay: J.biol.Chem. 150, 399
(1945)
13. King, J. und A.R.Armstrong: Can.med.Assoc. J. 31,
376 (1934)
14. Klemperer, F.W. u.a.: J.biol.Chem. 187, 189 (1950)
15. Kutscher, W. und J.Pany: Z.physiol.Chem. 255,
184 (1938)
16. Kutscher, W. und A.Wörner: Z.physiol.Chem.
239, 122 (1936)
17. Kutscher, W. und H.Wüst: Biochem.Z. 310, 292
(1941)
18. Lukhardt und Walter: Z.Physiol.Chem. 289, 247
(1952)
19. Moore, R.A. und R.F.Hanzel: Arch.Path. 22, 41
(1936)
20. Ohlmeyer, P.: Z.Naturforsch. 4b, 263 (1949)
Biochim.et biophys.Acta 4, 229 (1950)
21. Pearse, A.G.E.: Histochemistry, Theoretical and
Applied, London 1954
22. Reis, J.: Enzymologia 5, 251 (1938)
23. Romeis, B.: Mikroskopische Technik: S.289 (1948)

24. Rosenmund, H.: Unters. über s. Phosphataseakt.,
Basel (1953)
25. Rothman, S.: Physiol. and Biochem. of the Skin,
Chicago 1954
26. Rothstein, A. und R. Meier: J. cellul. comp. Physiol.
34, 97 (1949)
27. a) Roulet, F. und M. Brenner: Zbl. Ges. Tbs-Forschung
56, 193 (1944)
b) Roulet, F. u. a.: Die infekt. spezifischen Granu-
lome im: Handb. d. Allg. Pathologie, Bd. VII, 1
(Entz. und Imm.) 1956
28. Schwander, H. und R. Signer: Helv. chim. Acta 33, II,
1521 (1950)
29. Spier, H. W. und G. Pascher: Arch. f. Dermat. 200, 59
(1955)
30. a) Spier, H. W., G. Pascher und K. Martin: Dermatologica
(Basel) 111, 9 (1955)
b) Spier, H. W. und K. Martin: Arch. klin. und exp.
Dermat. 202, 120 (1956)

V. Lebenslauf

Am 5. März 1931 wurde ich in Braunau an der Steine als zweiter Sohn des Studienrates Ernst Wilhelm geboren. Volksschule und die ersten vier Klassen der Oberrealschule besuchte ich in Böhmisches-Leipa (CSR). Nach meiner Aussiedlung aus dem Sudetenland im Sommer 1945 war ich Schüler der Oberrealschule in Ansbach, wo ich am 13. Juli 1950 die Reifeprüfung ablegte. Sieben Semester meines Medizinstudiums verbrachte ich an der Würzburger Universität. Nach der Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes setzte ich mein Studium in München fort und konnte hier im Anschluß an das Wintersemester 1955/56 das med. Staatsexamen ablegen.

